

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kadi Lõhmussaar

LGR5-positiivsete rakkude päritolu kirjeldamine kahjustatud maksas

Magistritöö

Juhendajad:
Viljar Jaks, MD, PhD
Janeli Viil, MSc

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Maks – loomorganismi keskne organ.....	6
1.1.1 Maksa areng.....	6
1.1.2 Maksa ehitus	9
1.1.2.1 Maksa rakuline koosseis.....	10
1.1.3 Maksa funktsioonid	13
1.2 Maksa regeneratsioon.....	15
1.2.1 Koe regeneratsioon elujõuliste maksarakkude replikatsiooni arvelt	15
1.2.2 Somaatiliste tüvirakkude mudel maksa regeneratsioonis	16
1.2.2.1 LGR5 kui tüvirakkude marker kudede regeneratsioonis	18
1.2.3 Peamised maksakahjustuse mehhanismid hiiremodelil.....	20
2 EKSPERIMENTAALOSA	22
2.1 Töö eesmärgid	22
2.2 Materjal ja meetodika.....	23
2.2.1 Kasutatud hiireliinid	23
2.2.2 Hiirte genotüüpiseerimine	24
2.2.3 LGR5-positiivsete rakkude päritolu uurimise katseplaani	25
2.2.4 Koe fikseerimismetoodika optimeerimine ja külmutamine	27
2.2.5 X-galaktosidaasi töötlus	28
2.2.6 Immuunfluorestsentsanalüüs	29
2.2.7 FACS-analüüs.....	30
2.2.7.1 Kasutatud rakuliin	30
2.2.7.2 Hep3B rakkude transfektsioon	30
2.2.7.3 Transfekteeritud Hep3B rakkude FACS-analüüs	30
2.2.7.4 Hiirte anesteseerimine	31
2.2.7.5 Maksarakkude eraldamine	31
2.2.7.6 Maksarakkude FACS-analüüs	32
2.2.8 Kvantitatiivne analüüs	34
2.2.8.1 RNA eraldamine maksatükist ja DNAasi töötlus	34
2.2.8.2 cDNA süntees	34

2.2.8.3 Kvantitatiivne PCR (qPCR).....	35
2.3 Tulemused	36
2.3.1 PFA-perfusioon on efektiivseim maksakoe fikseerimismeetod	36
2.3.2 LGR5 ^{LacZ} süsteemi kontroll peensooles	37
2.3.3 Kõige rohkem LGR5 ⁺ rakke tekib maksas CCl ₄ kahjustuse korral.....	38
2.3.4 LGR5 ⁺ rakud ei pärine hepatotsüütidest ega sapiteede rakkudest.....	39
2.3.5 LGR5 ⁺ rakud on CD45 ⁺ F4/80 ⁺ Desmin ⁺ HNF4α ⁻ CK19 ⁻ Ki67 ⁻ OLFM4 ⁻	41
2.3.6 Immuunfluorestsentsanalüüsi tulemuste kinnitamine FACS-analüüsiga	43
2.3.6.1 CMFDG kit'i test Hep3B rakkudel näitas meetodi usaldusväärsust	43
2.3.6.2 LGR5-positiivsed rakud on CD44 ⁺ CD45 ⁺ F4/80 ⁺ tdTomato ⁻ EpCAM ⁻	44
2.3.7 LGR5 geeni ekspressiooni regulatsioon erinevate kahjustuste korral	47
2.4 Arutelu	48
KOKKUVÕTE	53
SUMMARY	54
TÄNUSÕNAD	55
KASUTATUD KIRJANDUS	57
LISAD	68
LIHTLITSENTS.....	74

KASUTATUD LÜHENDID

BEC – *biliary epithelial cells*, sapiteede epiteliaalsed rakud

BMP – *bone morphogenetic proteins*, luu morfogeneetilised valgud

BSA – *bovine serum albumin*, veise seerum albumiin

CCl₄ = süsiniktetrakloriid

CD – *cluster of differentiation*, diferentseerumise klaster

CK19 – *cytokeratin 19*, tsütokeratiin 19

CreERT – Cre, *causes recombination*, põhjustab rekombinatsiooni; ERT, *estrogen receptor truncated*, trunkeeritud östrogeeni retseptor

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-diamidiino-2-fenüülindool

DDC – 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine, 3,5-dietoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiin

(D)PBS – (*Dulbecco's phosphate buffered saline*, *Dulbecco* fosfaat-puhverdatud soolalahus

FACS – *fluorescent activated cell sorting*, fluorestsents-aktiveeritav rakusortimine

FGF – *fibroblast growth factors*, fibroblasti kasvufaktorid

HEX – *hematopoietically expressed homeobox*, hematopoeetiliselt ekspresseeritav *homeobox* (geen)

HGF – *hepatic growth factor*, maksa kasvufaktor

HNF – *hepatocyte nuclear factor*, hepatotsüüdi tuumafaktor

HSC – *hepatic stellate cells*, maksa tähtrakud

IMDM – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, *Iscove*'i modifitseeritud *Dulbecco* sööde

KC – *Kupffer cells*, Kupfferi rakud

NK – *Natural Killer (cells)*, loomulikud tapjarakud

LGR5 – *leucine-rich repeat-containing G protein binding receptor 5*, leutsiinirikkaid kordusi sisaldav G-valguga seonduv retseptor 5

NPC – *non-parenchymal cells*, mitteparenhümaalsed rakud

PHx – *partial hepatectomy*, osaline hepatektoomia

(q)PCR – (*quantitative*) *polymerase chain reaction*, (kvantitatiivne) polümeraasi ahelreaktsioon

SEC – *sinusoidal epithelial cells*, sinusoidaalsed epiteliaalsed rakud

STM – *septum transversum mesenchyme*, mesenhüümi transversaalne septum

tdTomato = tandemne dimeer Tomato

TTR – *transthyretin*, transtüretiin

X-gal = 5-bromo-4-kloor-3-indool-β-D-galaktopüranosiid

SISSEJUHATUS

Maksa on loomorganismi keskseks organiks, mille kaudu toimub mitmete eluliste protsesside pidev kontroll ja regulatsioon. Seetõttu on äärmiselt oluline tagada maksa pidev ja korrektne funktsioneerimine ning kiire reaktsioon kõrvalekallete korral. Niivõrd olulise organina ei ole ka üllatav maksa hämmastav võime kahjustuse korral efektiivselt regenereeruda.

Maksa iseloomustab ulatuslik regeneratsioonivõime, mille mehhanismi on püütud küll mitmeti erinevate teadustöödega seletada, kuid konsensust ei ole suudetud veel seni saavutada. Ühe võimaliku regeneratsiooni variandina nähakse klassikalist tüvirakkude mudelit, mille kohaselt on paikne või koeväline tüvirakuline reservuaar võimeline maksakahjustuse korral aktiveeruma ning koe taastumist toetama. Samas ei ole siiani sobivate markerite puudumisel selliste omadustega rakkude isoleerimisega maksas edu saavutatud. Hiljuti on aga mitmete teiste organismi kudede puhul identifitseeritud küllaltki usaldusväärne *bona fide* tüvirakumarker LGR5, mis on tekitanud lootust leida sarnase ekspressiooni-mustriga tüvirakke ka maksas. Tänapäevaks on antud rakupopulatsiooni uuritud üsna vähesel määral, mistõttu on vajalikud täiendavad uuringud antud rakkude spetsiifilisemate omaduste ja rolli selgitamiseks. Käesoleva magistritöö eesmärgiks on uurida maksa LGR5-positiivsete rakkude päritolu ning neid täiendavalt kirjeldada.

Töö kirjanduslik osa on jaotatud kaheks suuremaks sektsiooniks, millest esimesega antakse lähem ülevaade maksa üldisest arengust, histoloogilisest ehitusest ja funktsioonidest, ning teises suuremas alapeatükis keskendutakse spetsiifilisemalt maksa regeneratsioonile ning hetkel aktuaalsete regeneratsioonimehhanismide tutvustamisele. Samuti kirjeldatakse erinevaid kahjustusmodelite tüüpe, mille varal selle elutähtsa organi taastumist põhiliselt uuritakse. Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli teostada LGR5-positiivsete rakkude põlvnemisuuring ning neid põhjalikumalt kirjeldada. Juba seniste vähete uuringute põhjal on maksa LGR5 markerit ekspresseerivatele rakkudele omistatud potentsiaalseid tüvirakulisi omadusi. Maksa regeneratsiooni eest vastutavate rakkude defineerimine aitaks välja töötada uusi meetodeid krooniliste maksahaiguste raviks ja arendada rakupõhist teraapiat erinevatele maksakahjustustele.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

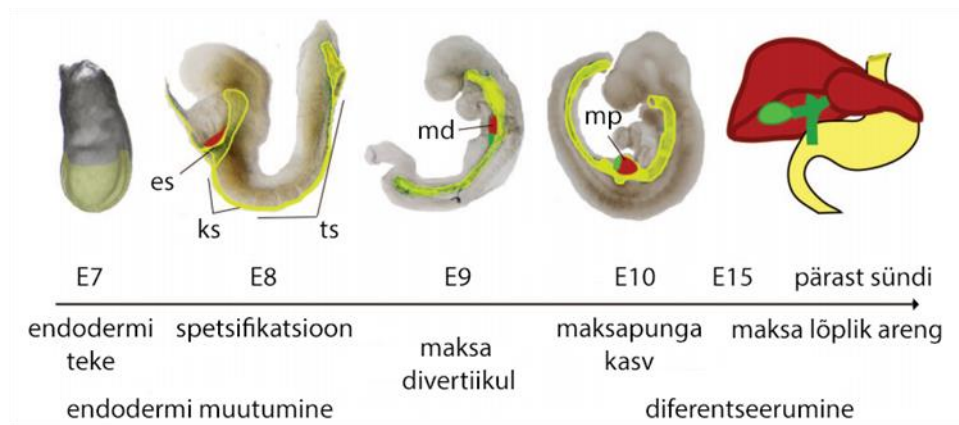
1.1 Maks – loomorganismi keskne organ

Maks on imetaja organismi suurim siseorgan, mis täidab mitmeid keskseid funktsioone organismi homöostaasi säilitamisel. Maksa füsioloogilisele olulisusele vaatamata on selle organi arengut mõjutavate molekulaarsete mehhanismide kohta tänaseks üsna vähe teada. Samas on pidev teadustöö viinud meid aasta-aastalt lähemale selle omapärase organi arenguloo ja muude omaduste täpsemale mõistmisele.

1.1.1 Maksa areng

Teadmised maksa organogeneesi põhisündmustest pärinevad ennekõike just erinevate mudelorganismidega teostatud uuringutest. Selliste organismide nagu kana, kannuskonna, sebrakala ja hiire kasutamine teadustöodes on toonud maksa arengubioloogia kirjeldamisel arvestatavaid edusamme ja on selgunud, et mitmed hepatogeneesi kontrollivad signaalirajad on evolutsiooniliselt konserveerunud. Kuigi maksa arengu põhiprintsiibid on mudelorganismidel sarnased, esineb protsessi täpsel ajaluses erinevate mudelite vahel siiski varieeruvust. Alljärgnevas peatükis käsitletakse maksa arengut spetsiifiliselt hiire näitel.

Hiire viljastamisjärgne embrüonaalne areng kestab 18-21 päeva (Rugh, 1968). Ligikaudu 6,5ndal embrüonaalsel päeval (E.6.5) on loode jõudnud gastrulatsiooni staadiumisse, mille oluliseks tähiseks on ürgjuti teke (Gardner ja Rossant, 1979; Tam jt, 1993). See struktuur on aluseks rakkude järgnevale suunatud liikumisele, moodustades 3 lootelehte (E7): endoderm, mesoderm ja ektoderm (Green, 1966). Maks on endodermaalset päritolu organ, mille arengut võib südame kõrval pidada ajaliselt üheks varaseimaks organogeneesi sündmuseks, ilmutades esimesi morfoloogilisi märke juba kõigest 10-12 somiidipaari staadiumis (E8.5-E9). Olenemata varasest alguspunktist on hepatogeneesi puhul tegu üsna pikaajalise protsessiga ning maks saavutab oma lõpliku massi ja suuruse alles sünnijärgselt. Seetõttu võib kirjanduses tihti kohata maksa arengukäigu jagamist erinevateks etappideks, mille hulka kuuluvad kompetentsuse saavutamine, spetsifikatsiooni/induktsiooni faas, maksapunga morfogenees (divertiikuli teke) ja kasv ning lõplik küpsemine (Joonis 1) (Zaret, 2000; Zorn, 2008).



Joonis 1. Maksa arenguetapid hiire näitel. Gastrulatsiooni käigus moodustub endoderm (E7), millest areneb ürgsool ees- (es), kesk- (ks) ja tagasoole (ts) piirkonnaga (E8). Seejärel toimub eessoole endodermi väljasopistumine (md) (E9) ja tekib maksapung (mp) (E10). Sellele järgneb maksa kasvamine ning hepatoblastide diferentseerumine hepatotsüütideks ja sapiteede rakkudeks. Maksa lõplik küpsemine toimub postnataalselt. Skeemil on kollasega kujutatud endoderm, punasega maks, rohelisega sapipõis ning E tähistab embrüonaalset päeva. Modifitseeritud (Zorn, 2008).

Kompetentsuse faas on vajalik rakkude edasiseks diferentseerumiseks maksarakkude suunas, mille käigus reguleeritakse rakkude võimet võtta vastu indutseerivaid signaale, et siseneda spetsifikatsioonifaasi. Transplantatsioonipõhiste uuringutega on välja selgitatud, et nii hiires kui teistes mudelorganismides suudab maks areneda vaid endodermaalset päritolu kindlast struktuurist, ventraalsest eessoole endodermist, mis viitab eelneva kompetentsuse olemasolule selles piirkonnas. Kompetentsi saavutamises osalevad vähemalt kolm erinevat transkriptsioonifaktorit, milleks on hepatotsüütide tuumafaktor 3 (HNF3, ingl *hepatocyte nuclear factor 3*), GATA4/6 (nimetus tuleneb seondumisest spetsiifilise GATA-motiiviga DNA-l) ja hematopoeetiliselt ekspresseeritav *homeobox* faktor (HEX, ingl *hematopoietically expressed homeobox*), mis on olulised eessoole varases organogeneesis (Bossard ja Zaret, 1998; Cirillo jt, 2002; Cirillo jt, 1998; Keng jt, 2000). Tegelikult on vastav kompetents olemas ka eessoole dorsaalsel piirkonnal, kus aga lähedalasuva mesodermi inhibeerivate signaalide mõjul spetsifikatsioonifaasi ei indutseerita (Bossard ja Zaret, 2000; Gualdi jt, 1996).

Maksa arenguks vajaliku kompetentsuse omandanud endodermaalsed rakud annavad aluse bipotentsetele maksa tüvirakkudele ainult juhul, kui neile on saadetud indutseeriv signaal. Juba varastest uuringutest on teada, et maksarakkude diferentseerumine on kohalis-ajaliselt mõjutatud lähedalasuvate mesenhümaalsete rakkude suunavatest signaalidest, mis pärinevad kas südame mesodermist või mesenhüümi transversaalsest septumist (STM, ingl *septum transversum mesenchyme*). Seni on identifitseeritud 3 spetsifikatsioonifaasis olulist signaalimolekuli, milleks on fibroblasti kasvufaktorid (FGF, ingl *fibroblast growth factor*), luu

morfogeneetilised valgud (BMP, ingl *bone morphogenetic proteins*) ja Wnt signaalirajas osalevad faktorid (Calmont jt, 2006; Hussain jt, 2004; Ober jt, 2006). Need signaalmolekulid on väga olulised epiteliaalses paksenemises ja maksapunga moodustumises ning väljakasvu sopistumises kõrval asuvasse mesenhüümi, mis on iseloomulikud kolmandale, morfogeneesi faasile (Tremblay ja Zaret, 2005).

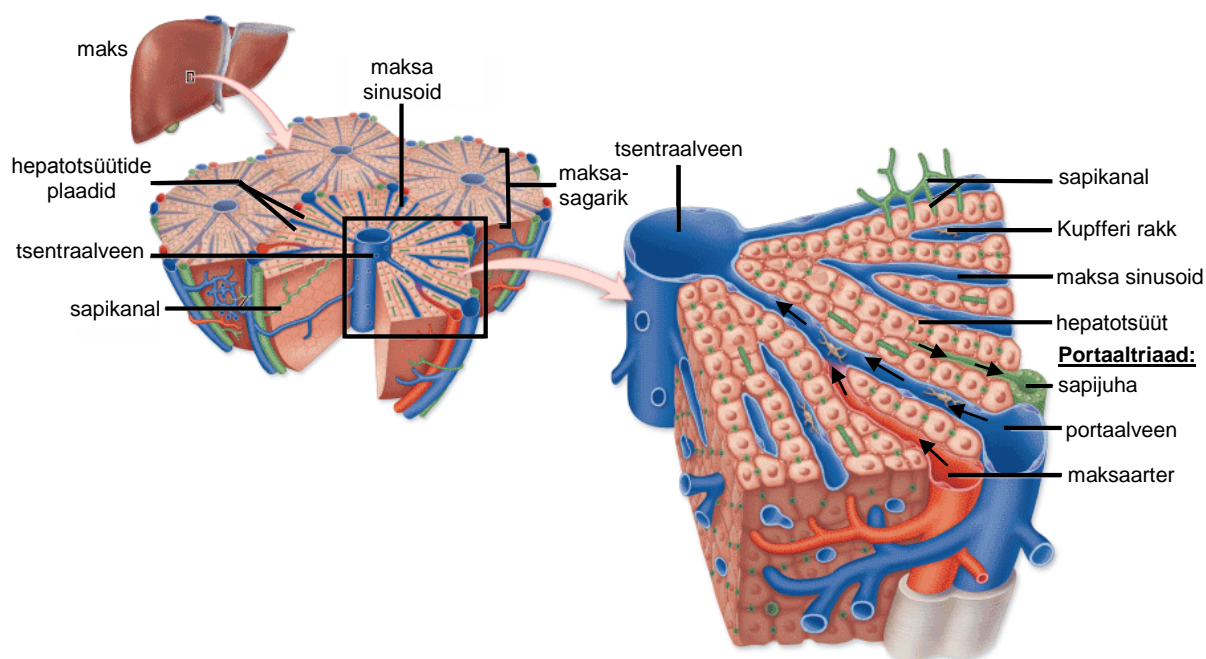
Ligikaudu 9ndal embrüonaalsel päeval (E9.0) algab maksa morfogenees, kus mitme järgneva päeva jooksul toimub maksapunga kasv ja areng hepatoblastide migreerumise ja diferentseerumise arvelt. Hepatoblaste on võimalik teistest rakutüüpidest eristada neile iseloomuliku ekspressioonimustri alusel, sünteesides selliseid faktoreid nagu α -fetoproteiin, transtüretiin (TTR, ingl *transthyretin*), albumiin ja HNF4 α (Costa jt, 2003; Germain jt, 1988). Bipotentsed hepatoblastid suudavad anda aluse kahele põhilisele rakutübile maksas: parenhüümi moodustavatele hepatotsüütidele ja sapiteid ääristavatele epiteliaalsetele rakkudele (Germain jt, 1988). Lisaks eelnimetatud rakkudele alustavad üsna pea (E10) kasvava maksapunga kolonisatsiooni ka hematopoeetilised rakud ning uuringute käigus on täheldatud, et E12.5 arenguetapil iseloomustab maksa juba väga hästi väljakujunenud vaskulaarne süsteem, mis sisaldab ka primitiivseid sinusoidaalseid struktuure (Nonaka jt, 2007). Seega omandab maks üsna varases arengus hematopoeetilise funktsiooni, mis mängib edasisel küpsemisel olulist rolli.

Maks säilitab hematopoeetilise funktsiooni terve embrüonaalse arengu vältel ning ka mõni aeg peale sündi (Borghese, 1959). Hematopoeetilise mikrokeskkonna loomises osaleb suur hulk rakke, kaasa arvatud hepatoblastid, mille puhul on näidatud erütrotsüütide teket toetavat rolli, tootes antud protsessi seisukohast olulisi tsütokiine, näiteks tüviraku faktorit ja erütropoetiini (Eckardt, 1996; Sugiyama jt, 2011). Hepatoblastide diferentseerumisega spetsialiseeritud rakutüüpideks kaob järk-järgult ka maksarakkude võime hematopoeetilist funktsiooni üleval hoida ning seda ülesannet täidab edaspidi luuüdi. Maksa küpsemise käigus formeerub embrüonaalne organ täielikult funktsioneerivaks maksakoeks, mis on võimeline pikaajaliselt säilitama oma spetsiifilisi funktsioone.

1.1.2 Maksa ehitus

Maks on anatoomilis-funktsionaalsest seisukohast üks kõige keerukamaid organeid selgroogsete organismis. Suurima siseorganina võtab antud organ enda alla ligi neljandiku kõhuõõne ruumalast, paiknedes vahetult diafragma võlvi all. Klassikalise makroanatomilise käsitluse alusel, mis põhineb maksa välispidistel tunnustel, koosneb antud organ neljast eri suuruse ja kujuga sagarast, mida nimetatakse parem-, vasak-, saba- ja ruutsagaraks. Kaks esimest on eelnimetatud sagaratest suurimad, mida lahutab üksteisest ümarside. Väiksemad saba- ja ruutsagar lokaliseeruvad parema sagara tagumisel küljel, kusjuures viimane paikneb sapipõie ümber (McIntyre, 1992). Sagarike pealispinda ja maksakoes paiknevat soonestikku katab läbipaistev sidekoeline kiht ehk Glissoni kapsel (Whitney, 1937). Hästi väljakujunenud juhadesüsteem muudab maksa äärmiselt hea verevarustusega organiks, kuhu transporditakse nii hapniku- kui toitaineterikast verd. Lisaks vaskulaarsetele ühendustele sisaldab maks ka rohkelt sapiteid, mis üheskoos annavad aluse väga korrapärasele mikro-anatoomilisele struktuurile.

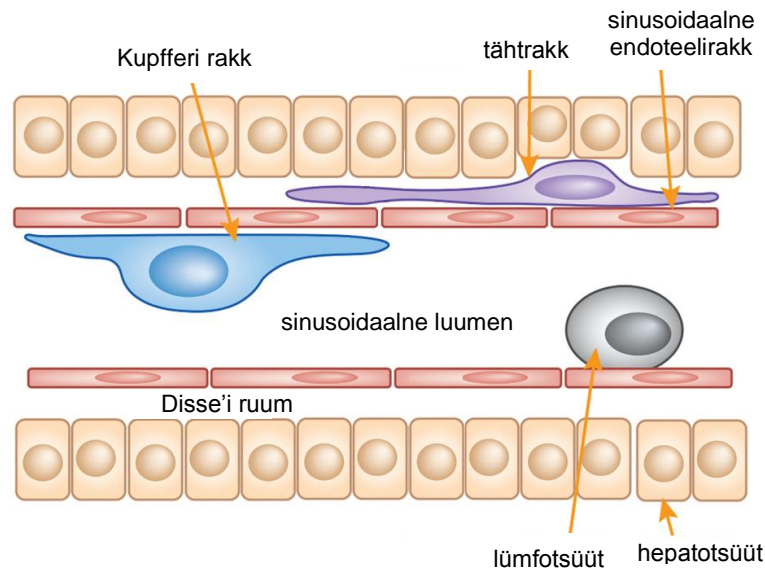
Histoloogiliselt on maks äärmiselt korrapäraselt struktureeritud organ, mille parenhüüm on organiseeritud tihedalt külg külje kõrval paiknevateks sagarikeks. Esmakordselt kirjeldas maksasagariku struktuuri Šveitsi patoloog J.J. Wepfer juba 1664. aastal seamaksa näitel (Bloch, 1970). Sagarikuks nimetatakse maksa põhilist morfofunktsionaalset ühikut, mida iseloomustab korrapärane kuusnurkne kuju (Joonis 2). Iga heksagonaalse sagariku keskel paikneb tsentraalveen ning igas kuusnurga eraldiseisvas tipus maksa portaaltriaad. Portaaltriaad koosneb oma nimega kooskõllaliselt kolmest elemendist, milleks on maksaarter, portaalveen ja sapijuha. Maksaarter varustab kude hapnikurikka verega, samas kui portaalveen kannab hapnikuvaest verd, mis on aga rikastatud toitainete ja metaboolsete kõrvalproduktidega. Vereringlus toimub mööda sinusoide portaallaladest tsentraalveeni suunas, kust maksarakkude poolt protsessitud veri jõuab viimaks õõnesveeni kaudu taas üldisesse ringlusesse. Sapi liikumise suund on vaskulaarsele süsteemile vastupidine ehk sapikanalites toimub sapi-vedeliku transport portaaltriaadi ja sealt edasi sapipõie või soolestiku algusosa suunas. Tänapäeval on teada, et see üle 300 aasta tagasi esmakordselt kirjeldatud maksa mikro-arhitektuur on olenemata väikesest liikidevahelisest varieeruvusest kõikide selgroogsete puhul analoogne (Strasberg, 1997; Whitmore, 1999).



Joonis 2. Maksasagariku ehitus. Maksakude koosneb kuusnurgakujulistest sagarikest, millest igaühe keskel paikneb tsentraalveen ning iga nurga tipus portaaltriaad. Portaaltriaad koosneb sapijuhast, portaalveenist ja maksaarterist. Mööda portaalveeni ja arterit liigub veri piki sinusoide tsentraalveeni suunas, sapivedeliku liikmissuund on vastupidine (suunad näidatud mustade nooltega). Sinusoidide vahele jäävad hepatotsüütide plaadid ning sinusoidide ja hepatotsüütide vahelises ruumis (Disse'i ruumis) paiknevad maksaspetsiifilised makrofaagid ehk Kupfferi rakud. Modifitseeritud (Mescher, 2009).

1.1.2.1 Maksa rakuline koosseis

Maksa ühtlasele koelisele arhitektuurile vaatamata pole selle organi rakuline koosseis sugugi homogeenne, vaid äärmiselt mitmekesine, sisaldades vähemalt 15 eri rakutüüpi, millest valdava enamiku moodustavad endodermaalset päritolu parenhümaalsed rakud ehk hepatotsüüdid (Joonis 3) (Daoust ja Cantero, 1959; Freudenberg jt, 1989). Kõikide ülejäänud maksa rakutüüpide kohta on kasutusel kollektiivne termin – mitteparenhümaalsed rakud (NPC, ingl *non-parenchymal cells*). Mitteparenhümaalsed maksa epiteelirakud pärinevad samuti endodermist, kuid põhiosas on NPC-de puhul tegu sinusoidaalsetes struktuurides paiknevate mesenhümaalsete rakkudega, mille koosseisu kuuluvad ka Kupfferi rakud, tähtrakud ja Pit'i rakud (Joonis 3). Alljärgnevalt antakse ülevaade maksa põhilistest rakutüüpidest.



Joonis 3. Maksa rakutüübid ja nende lokalisatsioon. Maksa sinusoidide ääristavad sinusoidaalsed endoteelirakud. Hepatotsüüdid on organiseeritud üherakukihiliste plaatidena sinusoidide vahele. Endoteelirakke ja hepatotsüüte eraldab üksteisest Disse'i ruum, kus paiknevad tähtrakkud. Kupfferi rakud ja lümfootsüüdid (k.a. Pit'i rakud) asuvad sinusoidide luumenis. Modifitseeritud (Jenne ja Kubes, 2013).

Organismi embrüonaalse arengu käigus tekivad bipotentsetest hepatoblastidest kaks erisugust endodermaalset rakutüüpi, milleks on hepatotsüüdid ja sapiteede epiteeliaalsed rakud (BEC, ingl *biliary epithelial cells*) (Rogler, 1997; Shiojiri, 1984). Hepatotsüüdid moodustavad maksarakkudest kõige arvukama populatsiooni, võttes enda alla ligi 80% maksa ruumalast (Blouin jt, 1977). Hepatotsüüdid on suuremõdulised (diameetriga 25-40 μm) polügonaalsed rakud, mis on imetajate maksas organiseeritud üherakukihiliste plaatidena sinusoidide vahele (vt Joonis 2). Tegemist on äärmiselt hea valgusünteesiga rakkudega, mida kinnitab nii tsütosoolis leiduv rohke endoplasmaatiline retiikulum kui mitokondrite arvukus (Blouin jt, 1977; Staubli jt, 1969). Epiteelirakkudele iseloomulikult on hepatotsüüdid polariseeritud rakud, mille apikaalse osa kaudu toimub sapi sekretsioon sapikanalite luumenisse ning basolateraalne külg on orienteeritud sinusoidide poole, mis hõlbustab toitainete ja metaboolsete kõrvalproduktide vahetust verega (Wang ja Boyer, 2004). Hepatotsüütide polariseeritus on suure füsioloogilise tähtsusega, tagades maksaspetsiifiliste funktsioonide korrektse täitmise.

Bipotentsetest hepatoblastidest tekib teinegi oluline maksa rakutüüp, milleks on sapiteid moodustavad epiteeliaalsed rakud ehk kolangiotsüüdid (Shiojiri, 1984). BEC-id kuuluvad endodermaalsete mitteparenümaalsete rakkude hulka ning täidavad olulist rolli sapi modifitseerimises ning transpordis. Asetsedes piki sapiteedest moodustuvat puutaolist võrgustikku varieeruvad kolangiotsüüdid nii oma kujult kui suuruselt ning esineb ka

funktsionaalset heterogeensust, mis väljendub eelkõige mitmete ensüümide ja membraan-seoseliste retseptorite erinevas ekspressioonimustris (Alpini jt, 1997; Alpini jt, 1996). Mõõda BEC-ide poolt vooderdatud sapiteid juhitakse sapivedelik hoiustamiseks sapipõide või vahetult soole algusossa ehk kaksteistsõrmiksoole, kus ta osaleb otseselt seedeprotsessis.

Lisaks kolangiotsüütidele kuuluvad mitteparenhümaalsete rakkude hulka ka mesenhümaalsed sinusoidaalsed endoteelirakud (SEC, ingl *sinusoidal endothelial cells*), mis moodustavad NPC-de fraktsioonist põhiosa. Need rakud asetsevad barjäärina vere ja hepatotsüütide vahel ning vahendavad antud kompartmentide vahelist ainevahetust (Joonis 3). Lamedakujulistele SEC-idele on iseloomulik akendunud ehk poore sisaldav membraan, millel puudub basaalmembraan (Wisse, 1970). Poorsed alad võtavad enda alla 6-8% rakupinnast (Cogger jt, 2010; Wisse jt, 1985). Tänu sellistele tunnusjoontele on tegu justkui selektiivse sõelbarjääriga, mis kontrollib vere ja maksarakkude vahelist ainevahetust ning selle vahendusel ka mikrotsirkulatsiooni (Clark jt, 1988; Wisse, 1970).

Luuüdist pärinevad mesenhümaalsed Kupfferi rakud (KC, ingl *Kupffer cells*) on maksas alaliselt resideeruvad makrofaagid (Joonis 3). KC-d moodustavad ligi 80% kõikidest täiskasvanud organismi maksas resideeruvatest makrofaagidest (Dory jt, 2003). Suuremal määral lokaliseeruvad need rakud portaalveenide läheduses paiknevate sinusoidide seintes ning väiksemal hulgal ka tsentraalveeni läheduses (Bouwens jt, 1986; Sleyster ja Knook, 1982). Kupfferi rakke on maksas kirjeldatud mitut erinevat tüüpi, mis näivad olevat spetsialiseerunud isesugustele ülesannetele. Üks alatüüpidest, mida iseloomustab F4/80 ja CD64 markeri koekspressioon (Ikarashi jt, 2013), mängib olulisemat rolli portaalvere puhastamises, fagotsüteerides baktereid, kahjustunud või vananenud erütrotsüüte ning ka vereringes esinevaid makromolekule (Bilzer jt, 2006). Lisaks on KC-de puhul tegemist ka antigeneen presenteerivate rakkudega, olles võimelised tootma erinevaid tsütokiine ja kemokiine (Seki jt, 2001). Eelnimetatud omadus on kujunenud tugevamalt välja just teisel kirjeldatud KC-de alatüübil, mis on positiivsed F4/80 ja CD11b markerikombinatsiooni suhtes (Ikarashi jt, 2013). Seega täidavad antud rakud olulist ülesannet peremeesorganismi immunoloogilises kaitses.

Lisaks Kupfferi rakkudele on maksa sinusoidid vooderdatud ka teise mesenhümaalset päritolu rakutüübiga ehk tähtrakkudega (HSC, ingl *hepatic stellate cells*), mis on võimelised hoiustama rasva ning vitamiin A-d (Wake, 1980). Erinevalt KC-dest on tähtrakud jaotunud ühtlaselt üle terve sinusoidaalse süsteemi (Higashi ja Senoo, 2003), paiknedes sinusoidide ja

hepatotsüütide vahelises Disse'i ruumis (Joonis 3). Neil on tähelepanuväärne kontraktsiooni-võime, tänu millele mängivad HSC-d tsentraalset rolli verevoolu regulatsioonis maksa sinusoidides (Rockey ja Weisiger, 1996). Maksakahjustuse korral on tähtrakud võimelised omandama aga hoopis uue rolli, transdiferentseerudes aktiveeritud müofibroblastitaolisteks rakkudeks (Potter jt, 1999). Seejuures põhilise ekstratsellulaarset maatriksit tootva rakuna maksas moodustavad aktiveeritud HSC-d vigastatud piirkonda ajutise armkoe, et takistada kahjustuse süvenemist (Benyon ja Arthur, 2001). Sellises olukorras toodavad HSC-d ka tsütokiine ja kasvufaktoreid, millest üks olulisemaid on hepatotsüüdi kasvufaktor (HGF, ingl *hepatocyte growth factor*), mis indutseerib maksa regeneratsiooni (Schirmacher jt, 1993).

Neljanda mesenhümaalse rakutüübina maksas väärivad esiletoomist Pit'i rakud (Joonis 3). Need rakud omavad morfoloogilist sarnasust suurtele granulaarsetele lümfotsüütidele, mis paiknevad sinusoidide luumenis, kinnituses endoteeli- või Kupfferi rakkude pinnale (Kaneda jt, 1983). Pit'i rakud on osa maksaseoseliste lümfotsüütide populatsioonist, mis omavad immuunreaktiivsete loomulike tapjarakkude (NK rakud, ingl *Natural Killer cells*) aktiivsust. (Bouwens jt, 1987). Pit'i rakud moodustavad pseudopood, mis võimaldavad neil aktiivselt mööda sinusoidide seinu liikuda (Wisse jt, 1976). Nad mängivad olulist rolli organismi esmases immunoloogilises kaitses, omades seejuures tugevamat loomulikku tsütotoksilist aktiivsust kui perifeerse vere NK-rakud (Vanderkerken jt, 1990; Vermijlen jt, 1999).

Maksa elutähtsate funktsioonide ülalpidamise seisukohalt on oluline koes resideeruvate rakkude vaheline pidev koordineeritud koostöö. Maksa funktsionaalsus tagab nii koesisese kui ka kogu organismi homöostaasi.

1.1.3 Maksa funktsioonid

Maks kui suurim siseorgan täidab mitmeid olulisi funktsioone, kusjuures täpsed tööülesanded sõltuvad sellest, millises arengustaadiumis organ parasjagu paikneb. Hiire maksa puhul räägitakse alates 10ndast embrüonaalsest päevast (E10) ennekõike kui hematopoeetilise organismi, kus on soodustatud vereloomerakkude areng, mille abil toimub kasvava organismi varustamine hapnikuga. Embrüonaalse maksa spetsiifilises mikrokeskkonnas toodetakse hematopoeesi kõrghetkel (E11.5-E14.5) mitmeid keemilisi signaale, mis atraktiivsete ühenditena soodustavad hematopoeetiliste tüvirakkude jagunemist ja diferentseerumist (Guo jt, 2009). Histoloogilise struktuuri küpsedes hakkab maksa hematopoeetiline roll järk-järgult taanduma (alates E15.5), lülitades esimeste sünnijärgsete päevade jooksul ümber täiskasvanud

organile omaste funktsioonide täitmisele (Guo jt, 2009; Sasaki ja Sonoda, 2000). Hematopoeetilise rolli võtab aga edaspidi üle vastava kompetentsuse saavutanud luuüdi (Delassus ja Cumano, 1996).

Paralleelselt maksarakkude küpsemisega omandab antud organ terve rea uusi elutähtsaid ülesandeid, mille hulka kuuluvad erinevate metaboolsete, ekso- ja endokriinsete protsesside regulatsioon. Organismi ainevahetuslikku homöostaasi aitab maks säilitada läbi erinevate süsivesikute, lipiidide ja valkude lagundamise sellisteks kasulikeks aineteks nagu glükoos, kolesterool, fosfolipiidid ja lipoproteiinid, mida on võimalik rakkudel üle terve keha lihtsasti taaskasutada. Üleliigset suhkrut hoiustatakse selles organis polüsahhariidse glükogeeni vormis, mida on vajadusel võimalik taas glükoosiks konverteerida ja energiaallikana kasutada (Moore jt, 2012). Valkude kasutuskõlbmatud osad metaboliseeritakse maksas aga ammoniumiks ning seejärel ureaks (Barej jt, 1987), mis transporditakse vere kaudu neerudesse ja väljutatakse organismist uriinina.

Lisaks eelnimetatud funktsioonidele käitub maks ka kui tõhus detoksifikatsiooni süsteem, mille kaudu toimub mürgiste ühendite eemaldamine verest ja nende kahjutustamine (Wagner jt, 2005; Wu jt, 2004). Maksa põhiliselt peritsentraalses alas paiknevad parenhümaalsed rakud toodavad sappi, mis aitab kaasa toitainete paremale seedimisele (Twisk jt, 1995). Samuti reguleeritakse maksa abil organismi hormonaalset tasakaalu, lagundades hemoglobiini, insuliini ja teisi üleliigseid hormoone (Doherty jt, 1990; Kimura jt, 1975). Mitmete ühendite lagundamisega paralleelselt toimub maksas ka oluliste plasmaelementide tootmine ja süntees ning varustatakse tähtsaid toitaineid, kaasa arvatud vitamiine (A, D, E, K ja vitamiin B12) ja rauda (Goldfischer jt, 1981; Miller jt, 1951; Olson ja Gunning, 1983).

Eelnimetatud funktsioonid moodustavad vaid väikse murdosa ülesannetest, mida maks igapäevaselt organismis täidab, kuid annavad aimduse, kui mitmekülgne on selle organi korrektne töö ning miks on oluline maksarakkude regulaarne ise-uenemine. Lisaks rakkude pidevale vahetumisele iseloomustab maksa ka hämmastav regeneratsioonivõime, mis kinnitab selle organi vajalikkust veelgi. Käesoleva kirjandusliku ülevaate järgnevas sektsioonis antakse ülevaade hetkel aktuaalsetest maksa regeneratsioonimehhanismi hüpoteesidest, tüvirakkude võimalikust osalusest ning LGR5 markerit ekspresseerivate rakkude tähtsusest antud protsessi regulatsiooni kontekstis.

1.2 Maksa regeneratsioon

Maks on suure regeneratsioonivõimega kude, mis on võimeline väga kiiresti kahjustuse järgselt oma massi ja funktsioone taastama. Näriliste puhul on näidatud, et maksakoe eemaldamisel ligi 70% ulatuses taastub antud organi algne mass juba kõigest 7-10 päeva möödudes (Bucher ja Swaffield, 1964). Paralleelselt koe parandamisega on elujõulised maksarakud võimelised käigus hoidma ka olulisemaid igapäevaseid funktsioone, millega on tagatud minimaalne kõrvalekaldumine normaalsest füsioloogiast (Greenbaum jt, 1995; Xu jt, 1993). Kuna maks täidab kogu organismi homöostaasi säilitamisel võtmerolli, siis võib sellist märkimisväärset ise-uuenemisvõimet pidada oluliseks evolutsiooniliseks kaitsemehhanismiks.

Kiirest ja tõhusast taastumisvõimest isegi suuremat tähelepanu väärib mitmete uurimustööde põhjal kujunenud arusaam, et maksakoe regeneratsiooni mehhanism sõltub kahjustuse tüübist. Arvatakse, et maks on kindlates tingimustes võimeline taastuma nii kahjustatud koes olemasolevate elujõuliste rakkude replikatsiooni kui ka organis resideeruvate somaatiliste tüvirakkude diferentseerumise arvelt. Samuti on näidatud luuüdist pärinevate hematopoeetiliste tüvirakkude võimet diferentseeruda hepatotsüütideks (Lagasse jt, 2000), kuid seni on peetud seda protsessi liialt aeglaseks, et kogu maksa regeneratsioon võiks olla vaid selle mehhanismiga täielikult seletatav (Cantz jt, 2004; Kanazawa ja Verma, 2003; Wagers jt, 2002). Seega ei ole kõnealuse unikaalse organi regeneratsioonis toimuvad rakulised ja molekulaarsed mehhanismid tänaseks veel täielikult lahendatud, esineb palju vasturääkivusi ja vastuseita küsimusi.

1.2.1 Koe regeneratsioon elujõuliste maksarakkude replikatsiooni arvelt

Maksa embrüonaalses arengus on hepatotsüütide ja kolangiotsüütide ühise eellasena identifitseeritud suure proliferatsioonivõimega hepatoblastid. Täiskasvanud organismis võib normaalset maksakude pidada aga üsna stabiilseks ning aeglaselt ise-uuenevaks organiks, kus eelnimetatud kahe põhirakutüübi elutsükli pikkuseks on hinnatud 200-400 päeva (Macdonald, 1961; Magami jt, 2002). Hoolimata hepatotsüütide normaalsest „vaikivast“ olekust on mitmete transplantatsiooni- ja põlvnemisanalüüsides välja selgitatud, et maksa üldmassi kirurgilise vähendamise tingimustes on hepatotsüüdid võimelised vastuseks kõrgeenenud kasvufaktorite tasemele väga kiiresti ja efektiivselt jagunema ning maksakahjustuse korral koe regeneratsiooni toetama (Lindroos jt, 1991; Overturf jt, 1997; Rhim jt, 1994; Wu jt, 1994). Üheks tõestavaks näiteks on 1997. aastal Overturf ja kolleegide poolt avaldatud

uurimustöö, kus transplanteeriti fumarüülatsetoatsetaat hüdrolaasi (FAH) puudulikku hiirde funktsionaalseid hepatotsüüte, misjärel toimus maksa täielik taastumine ning näidati, et hepatotsüüdid suudavad läbi teha vähemalt 70 järjestikust rakujagunemist (Overturf jt, 1997). Seepärast nimetatakse hepatotsüüte ja sapiteede rakke sageli ka maksa fakultatiivsete tüvirakkude reserviks, mis on võimelised maksa osalise eemaldamise korral efektiivselt maksa esialgset seisundit taastama. Kuid selline regeneratsioonivorm on piisavat kinnitust leidnud vaid eelnimetatud kahjustuse korral ning pole teiste kahjustustüüpide puhul eksperimentaalselt tõestatud.

Lisaks parenhümaalsetele rakkudele vajavad kindlate koekahjustuste korral regenereerumist ka sapiteede epiteeli rakud. Seniste uuringute põhjal on protsessi selgitamiseks välja pakutud teinegi huvitav mehhanism, mille kohaselt on hepatotsüüdid võimelised kolangiotsüütide funktsiooni häirumisel muutma oma spetsialiteeti ehk transdiferentseeruma sapiteede rakkudeks *in vitro* ning vastupidi, hepatotsüütide defekti korral on neid võimelised asendama transdiferentseeruvad kolangiotsüüdid (Furuyama jt, 2011; Limaye jt, 2010; Michalopoulos jt, 2005; Watanabe jt, 2008). Ka see mehhanism ei ole vastakate uurimustulemuste ning puuduliku *in vivo* tõestusmaterjali tõttu teadlaste täielikku usaldusväärsust võitnud (Carpentier jt, 2011; Malato jt, 2011; Tarlow jt, 2014). Samas teades, et antud rakutüübid pärinevad ühisest embrüonaalsest eellasest, võib rakkudevaheline transdiferentseerumise fenomen olla siiski küllaltki tõenäoline.

Eelnimetatud kaks mehhanismi ehk koe regeneratsioon elujõuliste maksarakkude ise-uuenemise või transdiferentseerumise arvelt kujutavad küll arvestatavaid hüpoteese, kuid põhjanevate uurimustulemuste puudumise korral kipub teadlaste hulgas alati valitsema arvamuste mitmekesisus. Seetõttu ei ole endiselt minetatud ka võimalust, et küpses maksas võiksid resideeruda palju kõneainet pakkuvad täiskasvanud tüvirakud, mille olemasolu korral nähakse neil juba praegu mitmeid potentsiaalseid terapeutilisi rakendusi maksahaiguste ravis.

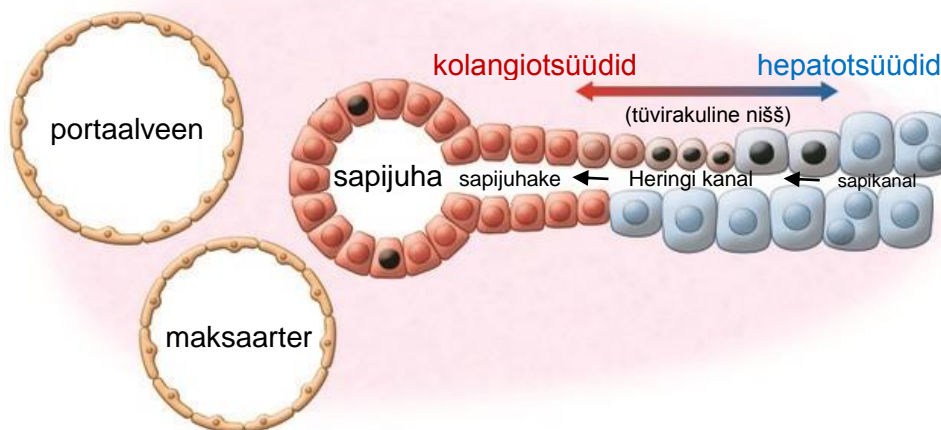
1.2.2 Somaatiliste tüvirakkude mudel maksa regeneratsioonis

Täna on teada, et mitmetes täiskasvanud organismi kudedes, kaasa arvatud soolestikus, nahas, maos ja mujal, aitavad homöostaasi säilitada somaatiliste tüvirakkude piiratud reservuaarid, mis paiknevad anatoomiliselt defineeritud struktuurides ehk niššides (Barker jt, 2007; Barker jt, 2010; Jaks jt, 2008). Tüvirakuline nišš kujutab endast erinevate faktoritega rikastatud kontrollkeskust, mis määrab tüvirakkude jagunemiskiiruse, tüvirakkude saatuse ja

tagab tüvirakulise reservuaari pideva jätkusuutlikkuse. Ka maksa suurt regeneratsioonivõimet on püütud põhjendada potentsiaalse tüvirakulise ressursi olemasoluga. Teadlaste järeleandmatu püüd identifitseerida täiskasvanud organismi tüvirakke maksas on küll tervitatav, kuid on ühteaegu põhjustanud ka suurt segadust, kuna paljudes uurimustöodes defineeritakse antud rakupopulatsiooni erinevalt, võttes isoleerimisel aluseks varieeruvaid markereid ning omistades uusi geeniekspressioonimustreid. Selle tulemusel on saadud palju üksteisele vasturääkivaid tulemusi, mille usaldusväärsuse hindamisega tuleb uurijatel pidevalt tegeleda.

Kuigi maksa tüvirakkude spetsiifiliste omaduste kirjeldamine vajab veel täiendavat uurimustööd, on teadlastel siiski õnnestunud kahjustuste tingimustes edukalt isoleerida tüvirakkude ja diferentseerunud rakutüübi üleminekuline vorm, mida nimetatakse nende ovaalse tuuma kuju alusel ovaalrakkudeks (Farber, 1956). Embrüonaalsetele hepatoplastidele sarnaselt on ovaalrakkude puhul tegemist kiiresti jaguneva bipotentse rakupopulatsiooniga, mis ekspresseerivad nii hepatotsüütidele kui sapiteede rakkudele omaseid markereid ja on võimelised diferentseeruma mõlema eelnimetatud rakutüübi suunas *in vitro* ja *in vivo* (Sirica, 1995; Sirica jt, 1990). Ovaalrakke normaalses maksa arhitektuuris ei esine ning nende teket on täheldatud ainult erinevate hepatotoksiliste maksakahjustuste tingimustes, kus on häiritud maksa regeneratsioon nii-öelda fakultatiivsete tüvirakkude ehk maksa põhirakkude proliferatsiooni arvelt (Petersen jt, 1998). Kõnealuste rakkude paiknemist on kahjustuste korral detekteeritud vaid periportaalse alade läheduses, mistõttu on arvatud selles regioonis lokaliseeruvat ka nende rakkude tüvirakuline eellaspopulatsioon (Fellous jt, 2009; Grisham ja Porta, 1964). Üheks võimalikuks ovaalrakkude „väljakasvu“ piirkonnaks on tihti pakutud portaalalas paiknevat Heringi kanalit (Kuwahara jt, 2008; Theise jt, 1999), mis kujutab endast sapijuha ja sapikanalite vahelist ühenduskohta (Joonis 4). See on piirkond, kus toimub sujuv üleminek ühelt rakutüübilt teisele ehk sapijuha moodustavatelt sapiteede rakkudelt sapikanaleid ääristavatele hepatotsüütidele. Just seetõttu peetakse Heringi kanalit tüvirakulise reservuaari seisukohast heaks strateegiliseks piirkonnaks, omades efektiivset infovahetust mõlema rakutüübiga. Ometi on hetkel ainsaks vihjeks tüvirakkude olemasolule ovaalrakud, mille seoselised uurimustulemused on olnud samuti segadust tekitavad. Näiteks on ovaalrakkude geeniekspressiooni uuringutega erinevates mudelorganismides ja ka inimeses näidatud, et antud rakud sünteesivad mitmeid diferentseerumise klatri (CD, ingl *cluster of differentiation*) põhiseid markereid, nagu CD34, CD90 (Thy-1), CD133 ja mõnevõrra üllatuslikult osade tööde alusel ka vereloomerakkude markerit CD45 (Crosby jt, 2002; Li jt, 2014; Omori jt, 1997; Petersen jt, 1998; Petersen jt, 2003; Yovchev jt, 2007). Selliste omaduste korral tuleb paratamatult arvestada võimalusega, et ehk on tekkinud maksa ja

vereloome tüvirakkude eristamise vahel segadus või on antud rakud tulenenud luuüdi päritolu prekursoritest, mis omavad oma rakupinna markerite ekspressioonimustris kattuvusi hematopoeetiliste rakkudega.



Joonis 4. Heringi kanali paiknemine periportaalses regioonis. Joonisel on kujutatud portaaltriaadi ehitus, mis koosneb portaalveenist, maksaarterist ja sapijuhast. Sapijuhad on ühendatud sapikanalitega, mida mööda liigub hepatotsüütide poolt sekreteeritud sapp sapijuhasse (sapi liikumise suund on näidatud mustade nooltega). Sapijuha ja sapikanali ühenduskohta nimetatakse Heringi kanaliks, kus arvatakse paiknevat tüvirakuline nišš. Modifitseeritud (Kordes ja Haussinger, 2013)

Tõsi on see, et ovaalrakud ei saa tekkida tühjale kohale ning neil peab olema mingisugune kahjustuse korral aktiveeritav maksasisene või –väline eellaspopulatsioon, kuid koe-spetsiifiliste tüvirakkude markerite puudumine on tõeliste maksa tüvirakkude kirjeldamisele ja isoleerimisele juba pikka aega olnud takistuseks.

1.2.2.1 LGR5 kui tüvirakkude marker kudede regeneratsioonis

Täiskasvanud organismi tüvirakkude paremaks isoleerimiseks ja kirjeldamiseks on erinevates uurimustöodes sageli püütud leida spetsiifilisi markerikandidaate, mis oleksid antud rakupopulatsioonile ainulaadsed. 2007. aastal Van der Flier'i ja kolleegide poolt avaldatud uurimustöös identifitseeriti soolestiku krüptirakkude geeniekspressiooni paneeluuringuga leutsiinirikkaid kordusi sisaldavat G-valguga seonduvat retseptorit (LGR5, ingl *leucine-rich repeat-containing G protein binding receptor 5*) kodeeriv geen, mis ekspresseerus vaid kindlates krüpti põhjas paiknevates rakkudes (Van der Flier jt, 2007). Järgnevad uuringud kinnitasid, et LGR5-positiivsed rakud on pikaajalised ja multipotentsed (Barker jt, 2007). Lisaks on kõnealust markerit ekspresseerivate rakkude tüvirakulisust suudetud tõestada ka käärsooles, maos ja karvafolliikulis (Barker jt, 2007; Barker jt, 2010; Jaks jt, 2008). Seega on

LGR5-st kujunenud usaldusväärne marker, mis tähistab mitmeid täiskasvanud organismi tüvirakke.

LGR5 on transmembraanne retseptor, mis kuulub glükoproteiinsete hormoonide retseptorite alamperekonda. Kõigile eelnimetatud perekonda kuuluvatele retseptoritele on omane unikaalse ektodomääni olemasolu, mis vastutab ligandi seondumise eest (Hsu jt, 1998). LGR5 retseptori ligandina on identifitseeritud sekreteeritav valk nimega R-spondiin 1 (Carmon jt, 2011; de Lau jt, 2011; Glinka jt, 2011). LGR5 retseptori ja tema ligandi omavaheline seondumine on oluline kanoonilises Wnt signaalirajas, kus antud interaktsiooni tulemusel võimendatakse signaali ülekannet (de Lau jt, 2011). Erinevate uuringutega on tõestatud, et Wnt signaalirada omab kontrollmehhanismi mitmete, sealhulgas ka kasvajaseoseliste tüvirakkude üle ning võib aidata säilitada tüvirakkude potentsust (Chen jt, 2014; Wexler jt, 2009; Yui jt, 2012).

Suure regeneratsioonivõime tõttu on arvatud, et ka maksakoes võiks leiduda ise-uenemist toetavaid somaatilisi tüvirakke. Kuna varasemate uurimuste põhjal on selgunud, et LGR5 marker märgib mitmetes kudedes täiskasvanud tüvirakkude populatsiooni, siis on püütud vastavat seost leida ka maksas. Tänapäevaks on teada, et normaalses kahjustumata maksakoes LGR5-positiivseid rakke ei esine. Erinevalt soolestiku- või naharakkudest ei vaja maksarakud ranget igapäevast uuenemist, vaid rakkude vahetumistsükkel toimub üsna aeglaselt, mistõttu puudub vajadus konstantselt aktiveeritud tüvirakupopulatsiooni järele. See on vastavuses „vaikivate“ tüvirakkude hüpoteesiga, mille kohaselt tüvirakuline vastus indutseeritakse vaid tõsiste kahjustuste korral, kuid koe normaalse homöostaasi säilitamisel nad ei osale. Tõepoolest, 2013. aastal avaldatud uurimustöös näitasid Huch ja kolleegid üksikute LGR5-positiivsete rakkude ilmumist hiire maksakoes peale kindlat tüüpi keemiliselt indutseeritud maksakahjustusi (Huch jt, 2013). Samas töös leidis kinnitust ka antud rakkude võime moodustada organoidilaadseid struktuure *in vitro* ning anda alus nii hepatotsüütidele kui ka sapiteede rakkudele. Kuna teadmised LGR5-positiivsetest rakkudest maksas pärinevad tänaseni vaid Huch ja kolleegide poolt avaldatud uuringust ning senini ei ole ilmunud neid tulemusi kinnitavaid ega ka ümberlukkavaid töid, siis edasised katsed on vajalikud, et lisada antud seisukohale usaldusväärsust ning lahendada selle väheuuritud rakupopulatsiooni päritolu küsimus. Käesoleva uurimustöö üheks eesmärgiks on tuvastada LGR5-positiivsete rakkude päritolu maksas ning leida täiendavaid markereid kõnealuste rakkude ekspressioonimustri kirjeldamiseks.

1.2.3 Peamised maksakahjustuse mehhanismid hiiremudelil

Maksa regeneratsiooni uurimiseks on kasutusele võetud mitmed erinevad maksakahjustuse mehhanismid. Maksavigastust on võimalik indutseerida nii keemiliste kui kirurgiliste vahendite abil. Alljärgnevalt antakse ülevaade kolmest kõige sagedamini kasutatavast kahjustustüübi mehhanismist ja märklaudadest.

Üks laialdaselt kasutatud keemilisi ühendeid maksakahjustuse tekitamiseks ja uurimiseks on süsiniktetrakloriid (CCl_4), mis imiteerib toksiinide poolt indutseeritud kahjustust maksas, kujutades seetõttu sobivat mudelit nii inimese maksafibroosi ja –tsirroosi tekkemehhanismide kui ka üldise regeneratsiooni uurimiseks (Cameron ja Karunaratne, 1936). Mitmete uurimustööde tulemusel on jõutud arusaamale, et CCl_4 manustamisel vallanduv maksa-kahjustus järgib üsna loogilist sündmuste jada. Detoksifitseeriva organina on maksa üheks ülesandeks eemaldada organismist mürgised jääkühendid. Ka CCl_4 metaboliseerimine toimub maksas, kuid antud ühendi katalüüsil vabaneb tsütokroomi P450 vahendusel hulgaliselt reaktiivseid hapnikuühendeid, mis põhjustavad maksakoes oksüdatiivset stressi (Recknagel jt, 1989). Vabad hapnikuradikaalid on võimelised seonduma mitmete rakuliste makromolekulidega, moodustades nukleiinhapete, valkude ja lipiidide agregaatide, mis omakorda tekitavad maksas nii ehituslikke kui ka funktsionaalseid häireid. Sellest tingituna on takistatud lipiidide transport, suureneb maksarakkude membraani läbilaskvus ja kaasub fibrootilisele koele omane liigne ekstratsellulaarse matriksi kuhjumine (Recknagel jt, 1989; Slater, 1987). Akuutse CCl_4 kahjustuse tagajärjel indutseeritakse tsentraalveeni läheduses paiknevates hepatotsüütides nekroos, mis omakorda kutsub esile põletikulise reaktsiooni ning infiltreeruvate vereloomerakkude arv suureneb märgatavalt (Heymann jt, 2009; Karlmark jt, 2008). Tulemuseks on lobulaarne rasvdüstroofia, põletik, apoptoos ja nekroos (Shi jt, 1998; Weber jt, 2003). CCl_4 indutseeritud mürgistuse tõsidus sõltub suuresti doosi suurusest ja kahjustuse kestvusest, mistõttu nõrgal kokkupuutel on maks võimeline akuutsest kahjustusest üsna kiiresti taastuma, kuid suuremas koguses korduvmanustamise korral kaasub juba ajaga progresseeruv fibroos, tsirroos ning sageli ka maksavähk (Dashti jt, 1992; Tsunematsu jt, 1994).

Teiseks keemiliseks abivahendiks maksa regeneratsiooni uurimisel on 3,5-dietoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiini (DDC, ingl *3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine*) sisaldav dieet, mis tekitab märkimisväärset kroonilist ja oksüdatiivset maksakahjustust. DDC on porfüriinogeenne kemikaal, mis põhjustab maksas sapiteede ummistumist ning sellejärgset tähttrakkude

aktivatsiooni ja ovaalrakulist vastust, millest viimane on kergesti tuvastatav prolifereruvate sapiteede epiteliaalsete rakkude markeri A6 ekspressiooniga (Preisegger jt, 1999). Samuti algatatakse antud ühendi toimele varane ja tugev immuunrakuline reaktsioon, mida tõestab mitmete tsütokiinide, nagu IL-6 ja TNF- α üleekspressioon kahjustunud koes (Plum jt, 2010). Hiirte hoidmine DDC dieedil põhjustab maksas sapiteede rakkude reaktiivset fenotüüpi, mille tunnuslikeks ilminguteks on sapiteede proliferatiivne vastus, periduktulaarne fibroos ning portaalalade vaheliste septide teke (Fickert jt, 2007). Kahjustuse tulemusel moodustuvad koes iseloomulikud Mallory kehakesed, mis kujutavad endast hepatotsellulaarseid inklusioonkehakesi, mida on tihti seostatud erinevate maksahaigustega, näiteks alkoholne ja mitte-alkohoolne maksa rasvdüstroofia, metaboolsed haigused ning krooniline kolestaatiline maksahaigus (Denk jt, 2000; Fickert jt, 2002; Fickert jt, 2003).

Maksapõhiste uuringute teostamiseks on lisaks keemilistele vahenditele kasutusele võetud ka kirurgilised meetmed. Maksa osaline hepatektoomia (PHx, ingl *partial hepatectomy*) on kõige klassikalisem maksa regeneratsiooni uurimiseks kasutatav kahjustusmudel, mille korral eemaldatakse katselooma maksakoest teatud osa, sageli 70%, põhimassist. PHx indutseerib hepatotsüütide ja mitteparenhümaalsete rakkude väljumist vaikeolekust ning sellejärgset proliferatsiooni vastuseks mitmetele immuun-, hormonaal- ja metaboolsetest kaskaadidest pärinevatele signaalidele (Michalopoulos, 2010). Erinevalt keemilistest kahjustustest, millega kaasub alati koe hüpoksia, rakusurm ja põletik (McDonald jt, 2008; Zaret ja Grompe, 2008), ei ole PHx mudeliga tekitatud kahjustus nii äge ning võimaldab eelkõige uurida fakultatiivsetele tüvirakkudele omaseid koeparandamise mehhanisme, kuna maksarakkude funktsioon ei saa häiritud (Greene jt, 2003).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesolev töö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on nii maksa histoloogilise ehituse, rakkude ekspressioonimustri kui ka rakuvälise maatriksi muutuste kirjeldamise põhjal moodustada terviklikum pilt normaalse ja kahjustatud maksakoe erinevustest. Võrreldes regulatsioonimehhanisme, mis juhivad maksarakkude aktiivsust normaalses ja kahjustatud maksas, loodame leida uusi võimalusi maksahaiguste paremaks raviks ning maksarakkude efektiivseks kehaväliseks paljundamiseks. Kuna tüvirakkude roll maksakahjustustest paranemisel on veel ebaselge, siis üheks uurimisobjektiks on laialt aktsepteeritud tüvirakkude markeri *LGR5* ja seda ekspresseerivate rakkude kirjeldamine erinevate maksakahjustuste korral, millel antud magistritöö põhinebki.

Käesoleva magistritöö eesmärkideks on:

- optimeerida maksakoe fikseerimisprotokolli, mis võimaldaks uurida antud koe arhitektuuri, kasutades kahes järgnevas punktis väljatoodud meetodeid;
- uurida *LGR5*-positiivsete rakkude võimalikku põlvnemist hepatotsüütidest või sapiteede rakkudest, integreerides omavahel *LGR5^{LacZ}* reportersüsteemi ja Cre-loxP põhise rekombinatsioonitehnoloogia hepatotsüütide ja sapiteede rakkude jälgimiseks ajas;
- tuvastada *LGR5*-positiivsetele rakkudele omaseid täiendavaid markereid immuunfluorestsents- ja FACS-meetodil;
- kirjeldada erinevate maksakahjustuste mõju *LGR5* geeni ekspressioonitaseme muutustele maksakoes.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud hiireliinid

Käesolevas töös kasutati LGR5-positiivsete rakkude kirjeldamiseks LGR5^{LacZ} heterosügootseid ning päritolu uurimiseks LGR5^{LacZ}-CK19^{cre}-tdTomato ja LGR5^{LacZ}-TTR^{cre}-tdTomato kolmikheterosügootseid hiiri, mis saadi tabelis 1 väljatoodud hiireliinide omavahelisel ristamisel.

Tabel 1. Kasutatud hiireliinid.

Hiireliin	Kirjeldus	Saamise meetod	Päritolu
LGR5^{LacZ} (edaspidi LGR5 ⁺)	LacZ ensüümi ekspressioon LGR5-positiivsetes rakkudes	<i>knock-in</i>	Lexicon Pharmaceuticals, USA
CK19^{CreERT} (edaspidi CK19 ⁺)	CreERT rekombinaasi ekspressioon sapiteedes	<i>knock-in</i>	Cedric Blanpain, Brüsseli Ülikool, Belgia
TTR^{CreERT} (edaspidi TTR ⁺)	CreERT rekombinaasi ekspressioon maksa parenhüümirakkudes	transgenees	Tannour-Louet, Cochini Instituut, Prantsusmaa
Rosa26-tdTomato (edaspidi TOM ⁺)	tdTomato ekspressioon Cre rekombinaasi mõjul	suunatud mutagenees	Jackson Laboratories, USA

CK19 – tsütokeratiin 19; TTR – transtüretiin; CreERT (Cre, ingl *causes recombination*; ERT, ingl *estrogen receptor truncated*); tdTomato – tandemne dimeer Tomato

Katsetes kasutati nii isaseid kui emaseid tabelis 1 toodud mutantide suhtes heterosügootseid hiiri. Katseloomi hoiustati ja paljundati Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi vivaariumis 12 tunni valguse/pimeduse tsükli tingimustel, vaba juurdepääsuga veele ja toidule. Loomade eluruumis oli õhutemperatuur pidevalt $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Kõik loomkatsed teostati loomakaitseseaduse kohaselt loomkatse loa nr 25 alusel (Lisa 1). Töö autor on läbinud 7. veebruaril 2014 „Katseloomateadus I“ koolituse ning omab loomkatsete tegemiseks ettenähtud tunnistust (Lisa 2), mis on kooskõlas Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivi 2010/63/EL nõuetega. Kõik hiirte anesteseerimised teostas vastavat luba omav TÜ Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi vivaariumi juhataja Sulev Kuuse ning operatsioonid viis läbi Rakubioloogia õppetooli doktorant ning käesoleva magistratöö kaasjuhendaja Janeli Viil.

2.2.2 Hiirte genotüpiseerimine

Hiirte omavaheliseks eristamiseks pandi igale järglasele iseloomulik kood, mis koosnes antud hiire pesakonna- ja järjekorranumbrist. Genotüpiseerimiseks vajalik DNA eraldati sabatükist. Selleks lisati igale koeproovile 75 µl lüüsi puhvrit (25 mM NaOH, *AppliChem* ja 0,2 mM EDTA pH 8.0, *Sigma-Aldrich*) ning inkubeeriti proove 95°C juures 45-60 minutit. Peale kuumutamise etappi lisati proovidele täiendavalt 75 µl neutralisatsioonipuhvrit (40 mM Tris·HCl pH~5, *Reahim*), millele järgnes 1 minut segamist vortexil. Saadud DNA lahuseid hoiustati -20°C juures.

LGR5⁺, CK19⁺, TTR⁺ ja TOM⁺ genotüüpide kindlakstegemiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR, ingl *polymerase chain reaction*). Tabelis 2 on välja toodud kõigi kasutatud praimerite järjestused, reaktsiooni käigus saadavate produktide pikkus ning sihtmärk.

Tabel 2. Kasutatud PCR-i praimerid. F – pärisuunaline; R – vastassuunaline; *wt* – metsik-tüüp ehk positiivne kontroll; bp – aluspaar.

Praimerite komplekt	Praimeri järjestus 5' → 3' suunas	Produkti pikkus	Tuvastab
LGR5	F 5'-CCTCTTTGCTAAACCTCACC-3'	673 bp	<i>wt</i>
	R 5'-ACGAGTCTTCTCACTATGGG-3'		
	F 5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'	467 bp	LGR5-LacZ mutant
	R 5'-ACGAGTCTTCTCACTATGGG-3'		
CK19	F 5'-AATCGCCAGGAATTGACCAATGGG-3'	369 bp	CK19 cre mutant
	R 5'-CGGCAAACGGACAGAAGCATTTTCC-3'		
	F 5'-AATCGCCAGGAATTGACCAATGGG-3'	265 bp	<i>wt</i>
	R 5'-CGCCCGTACCCCCAAAGGAAGACAT-3'		
TTR	F 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3'	400 bp	TTR-cre mutant
	R 5'-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3'		
TOM	F 5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA-3'	297 bp	tdTomato mutant
	R 5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTC-3'		
	F 5'-CTGTTCTGTACGGCATGG-3'	196 bp	<i>wt</i>
	R 5'-GGCATTAAGCAGCGTATCC-3'		

Igaks PCR-iks valmistati ette 20 µl lõppmahuga reaktsioonisegu, mis sisaldas 4 µl 5x *FIREPol® Master Mix* puhvrit (*Solis BioDyne*), 50 pg vastavaid primereid ning 2 µl DNA-d, mis viidi lõppruumalani lisades mQ-vett. PCR-i läbiviimiseks kasutati *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* (*Life Technologies*) masinat ning praimerite seondumistemperatuuri ja produktide pikkuse alusel kombineeritud universaalseid parameetreid:

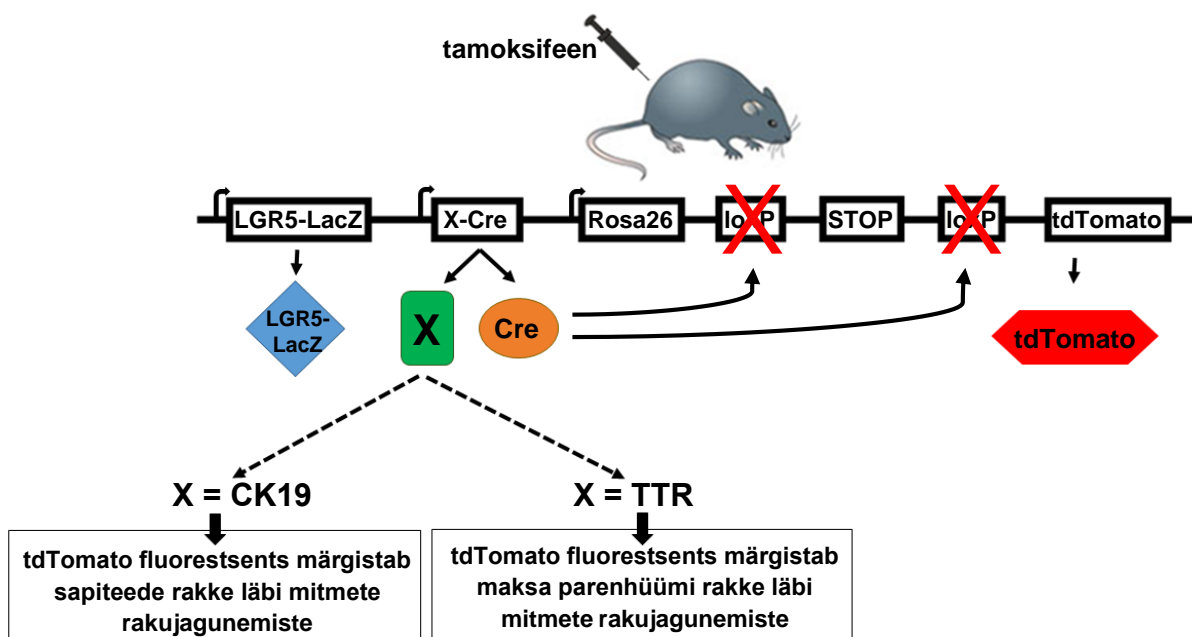
Etapid	Temp.	Aeg	
1. Algne denaturatsioon	94 ⁰ C	5 min	
2. Denaturatsioon	94 ⁰ C	30 sek	} 30 tsüklit
3. Praimerite seondumine	64 ⁰ C	30 sek	
4. Elongatsioon	72 ⁰ C	30 sek	
5. Lõplik ekstensioon	72 ⁰ C	5 min	

PCR-i produktide pikkuste hindamiseks kasutati agaros-geelelektroforeesi. Selleks valmistati 1,7%-line agarosgeel (*Lonza*), millele lisati nukleiinhapete aluspaaride vahele seonduvat UV-lainepikkusel fluorestseeruvat etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,01 µg/µl. DNA fragmentide pikkuste kindlaksmääramiseks kasutati 50 aluspaari suurust DNA markerit (50 bp DNA ladder, *Thermo Scientific*).

2.2.3 LGR5-positiivsete rakkude päritolu uurimise katseplaan

LGR5⁺ rakkude päritolu identifitseerimiseks koostati järgmine katseskeem, kus märgistati Cre-loxP süsteemi abil sapiteede (CK19⁺) või hepatotsüütide (TTR⁺) päritolu rakud. Selleks kasutati PCR-iga tuvastatud LGR5⁺-CK19⁺-TOM⁺ või LGR5⁺-TTR⁺-TOM⁺ kolmikheterosügootseid hiiri. Antud genotüüpidega hiirte puhul oli võimalik LGR5-positiivseid rakke tuvastada kõnealuse geeni viimasesse eksonisse sisestatud LacZ järjestuse abil, mis kodeerib β-galaktosidaasi ensüümi. β-galaktosidaas katalüüsib X-gal'i substraadi lisamisel viimase lagunemist, mille käigus tekib iseloomulik sinakas värvusreaktsioon. Seega X-gal'i töötamise tulemusel värvuvad kõik LGR5-positiivsed rakud koelõigul siniselt.

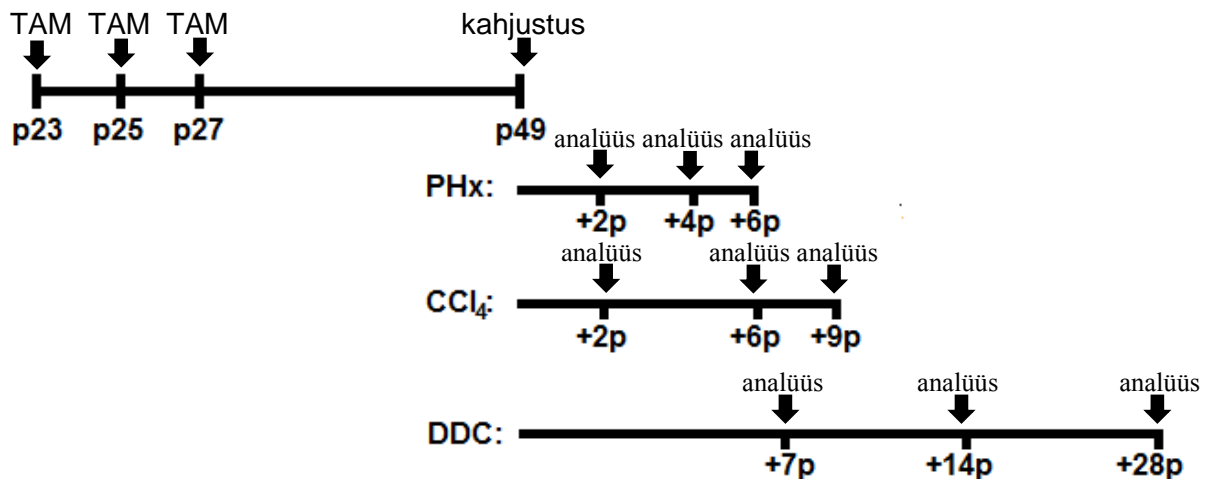
Selleks, et tuvastada LGR5-positiivsete rakkude päritolu, ekspresseerisid kolmikheterosügootsed hiired *CK19* või *TTR* geeni promootori alla asetatud tsütoplasmaatilist Cre rekombinaasi, mis oli fuseeritud muteeritud östrogeeni retseptoriga. Cre-loxP süsteemi aktiveerimiseks süstiti emast võõrutatud hiire kõhuõõnde kokku kolmel korral (23., 25. ja 27. päeva vanuses) 100 µl rapsiõlis lahustatud östrogeeni analoogi tamoksifeeni (*Sigma-Aldrich*) (20 mg/ml), mis võimaldas rekombinaasil liikuda rakutuuma. Tuumas indutseeriti Cre-rekombinaasi toimel *Gt(ROSA)26Sor* lookuse LoxP piirkondade vahel deletsioon, mis eemaldas tdTomato ekspressiooni takistava stoppkoodoni. Seeläbi tagati konstitutiivne ja rakujagunemisel edasikanduv tdTomato ekspressioon. Eelkirjeldatud süsteem võimaldab kahjustamisjärgselt hinnata LGR5-positiivsete rakkude võimalikku päritolu CK19⁺ sapiteede või TTR⁺ hepatotsüütide rakupopulatsioonist (Joonis 5).



Joonis 5. LGR5-positiivsete rakkude jälgimise skeem LacZ-i ja tdTomato aktiveerimise kaudu. Tamoksifeeni süstimisega aktiveerub *CK19* või *TTR* geeni promootori alla asetatud Cre-ensüümi rekombinaasne aktiivsus, mille tulemusel eemaldatakse loxP-saitide vaheline STOP-koodon, võimaldades konstitutiivset tdTomato ekspressiooni läbi mitmete raku jagunemiste. Kahjustusjärgselt tekkivaid LGR5-positiivseid rakke tuvastatakse LacZ aktiivsuse kaudu.

Kuna LGR5-positiivsete rakkude puhul on näidatud nende aktivatsiooni ja/või ilumist maksakoes alles kahjustusjärgselt, siis kasutati nende rakkude päritolu uurimiseks 3 erinevat maksakahjustust (CCl₄, DDC dieet, PHx). Kahjustused tekitati 49 päeva vanustel täiskasvanud hiirtel. Kahjustuste eripäradest lähtuvalt uuriti maksa histoloogilist ehitust erinevatel ajapunktidel (Joonis 6):

- CCl₄ kahjustuse korral manustati hiirtele intraperitonaalselt 20%-list kemikaali (*Acros Organics*) lahustatuna rapsiõlis kilogrammi hiire kohta. Hiired eutaniseeriti 2., 6. või 9. päeval pärast kahjustust.
- DDC kahjustuse korral hoiti hiiri DDC-dieedil (*Ssniff Spezialdiäten*) 1, 2 või 4 nädalat, misjärel hiired eutaniseeriti. DDC toksiini oli lisatud 100 mg/kg toidu kohta.
- PHx kahjustuse korral eutaniseeriti hiired 2., 4. või 6. päeval peale operatsiooni.



Joonis 6. Tamoksifeeni süstimise ja kahjustuste tekitamise skeem. Cre-loxP süsteemi aktiveerimiseks süstiti hiir 23., 25. ja 27. elupäeval (p23, p25, p27) tamoksifeeniga (TAM). Täiskasvanud hiirtele (p49) tekitati erinevaid kahjustusi (PHx, CCl₄, DDC) ning analüüsiti koeproove joonisel märgitud ajapunktidel.

Igas ajapunktis kasutati vähemalt kolme rakkude jälgimist võimaldava genotüübiga hiirt. Negatiivse kontrollina käsitleti DDC dieedi puhul metsiktüüpi hiiri, CCl₄ kahjustuse korral puhta rapsiõliga süstitud hiiri ning PHx korral hiiri, kellele oli teostatud kontrolloperatsioon ehk avatud ja suletud hiire kõhuõõs ilma kahjustuse tekitamiseta. Loomad hukati tservikaalse dislokatsiooni teel.

Cre-loxP süsteemi abil aktiveeritud tdTomato märkumise efektiivsust hinnati LGR5⁺-CK19⁺-TOM⁺ genotüübiga hiirte puhul CK19 antikehaga detekteeritud sapiteede rakkude ja tdTomato't ekspresseerivate rakkude suhtega. LGR5⁺-TTR⁺-TOM⁺ genotüübiga hiirte puhul kasutati efektiivsuse määramisel HNF4α antikehaga detekteeritud hepatotsüütide ja tdTomato't ekspresseerivate rakkude suhet. Mõlemal juhul koguti loendusandmed 3 hiire maksalõikudelt, loendades igal koelõigul 5 erineval mikoskoobiväljal asuvad HNF4α-, CK19- ja tdTomato-positiivsed rakud.

2.2.4 Koe fikseerimismetoodika optimeerimine ja külmutamine

Kudede fikseerimiseks oli vajalik välja töötada efektiivne protokoll, mis võimaldaks X-galaktosidaasi töötluste järgset kudede värvimist erinevate antikehadega ning tdTomato fluorestsentsi samaaegset säilitamist. Optimaalseima meetodi leidmiseks testiti läbi mitmed variandid:

- Maksakoe eelfikseerimiseta külmutamine;
- Erineva kestusega (0,5h, 1h, 2h, üleöö) maksakoe eelfikseerimine 4%-lises paraformaldehüüdis (PFA, *AppliChem*) 4°C juures;
- Maksa PFA-perfusioon portaalveeni kaudu ning sellejärgne kohene külmutamine;
- Maksa PFA-perfusioon portaalveeni kaudu ning sellejärgne inkubeerimine 30%-lises sahharoosilahuses 4°C juures (a) kuni maksatükk lahuse põhja vajub või (b) üleöö;
- Soole, põrna ja pankrease prepareerimiseks kasutati antud töös läbivalt ühte ja sama fikseerimismetoodikat, milleks oli koe fikseerimine 1 tund 4°C juures.

Nii eeltöödeldud kui ka -töötlemata maksaproovid asetati külmutamiseks krüovormidesse (*Sakura Finetek*) ning kaeti *Tissue-Tek® O.C.T. Compound* (*Sakura Finetek*) külmutamisseguga. Proovid külmutati vedelas lämmastikus jahutatud isopentaani (*AppliChem*) lahuses ning kudesid hoiustati -80 °C juures. RNA eraldamiseks lõigati maksast 1,5 ml tuubidesse eraldi valmis ligikaudu 30 mg kaaluvad koetükid, mis asetati seejärel kiiresti vedelasse lämmastikku ning hoiustati RNA eraldamiseni -80°C kapis.

X-galaktosidaasi töötluste ja järgneva immuunfluorestsentsanalüüsi teostamiseks lõigati külmutatud maksast krüostaatmikrotoomiga (*Slee Technik*) 5-7 µm paksused koelõigud, mis asetati spetsiaalsele *StarFrost®* (*Waldemar Knittel*) alusklaasile. Klaasidele lõigatud koelõike hoiti üleliigse vee aurustumiseks tund aega toatemperatuuril ning säilitati -20 °C juures.

2.2.5 X-galaktosidaasi töötlus

X-galaktosidaasi töötlustele eelnevalt pesti klaasidele lõigatud eelfikseeritud koe lõike 2 korda 5 min 1x fosfaat-puhverdatud soolalahuses (PBS, ingl *phosphate buffered saline*). Seejärel inkubeeriti koelõike spetsiaalses töölahuses, mille saamiseks valmistati X-gal'i lahjenduspuhver, mis sisaldas 2 mM MgCl₂ (*AppliChem*) ja 0,01% Nonidet® P40 (*AppliChem*) 1x PBS-is. Vahetult enne töölahuse kasutamist lisati lahjenduspuhvrile 5 mM lõppmolaarsusega K₃Fe(CN)₆ ja K₄Fe(CN)₆ (*Sigma-Aldrich*) ning saadud segu eelsoojendati termostaadis 37°C-ni. Viimase komponendina lisati lahusele 5-bromo-4-klooro-3-indool-β-D-galaktopüranosiidi (X-gal, 20 mg/ml, *Sigma-Aldrich*) lahust N,N-dimetüülformamiidis (DMF; *Acros Organics*) suhtes 1:40-le. Inkubatsioon toimus üleöö 37°C kapis pimedas niisutatud kambris. Järgmisel päeval eemaldati klaasidelt X-gal töölahus, pesti lõike 3 korda 2 min 1x PBS-is, millejärgselt teostati hematoksüliinvärving (*Carl Roth*) ja sulundati klaasid sulundusvedelikus (*Dako*) või jätkati immuunfluorestsentsanalüüsiga.

2.2.6 Immuunfluorestsentsanalüüs

X-gal'i töötluste läbinud koelõike pesti 2 korda 5 min 1x PBS-is ning vabastati antigeenid, inkubeerides klaase 10 mM Na-tsitraatpuhvris (pH 8.5) 30 min 80°C kuumaveevannis. Antigeenide vabastamise protseduur jäeti vahele siis, kui sooviti kasutada hiire F4/80 antikeha (Tabel 3), kuna tsitraaditöötlus takistas eelnimetatud antikeha seondumist oma antigeenidele. Kuumutatud klaasidel lasti 30 min toatemperatuuril jahtuda, misjärel pesti klaase 3 korda 2 min 1x PBS-is. Peale pesu lisati igale koelõigule 100 µl antikehade mittespetsiifilist seondumist blokeerivat 1%-list lõssilahust (*AppliChem*) 1x PBS-is, mis sisaldas rakke permeabiliseerivat 0,1% TritonX-100't (*AppliChem*) ja inkubeeriti 30 min toatemperatuuril, millele järgnes pesu 1x PBS-is. Seejärel teostati koeproovide täiendav blokeerimine 4% kitse või eesli seerumi-PBS lahuses 30 min toatemperatuuril. Peale blokeerimist inkubeeriti koelõike primaarsete antikehadega (Tabel 3) üleöö 4°C juures niisutatud kambris.

Tabel 3. Kasutatud antikehad ja nende lahjendused.

Primaarsed antikehad	Peremees-organism	Lahjendus	Märklaud	Päritolu
HNF4α	kits	1:400	hiire hepatotsüüdid	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
CK19	küülik	1:10000	sapiteede epiteelirakud	<i>Epitomics</i>
CD45-PE	rott	1:500	hiire vereloomerakud	<i>eBioscience</i>
F4/80	rott	1:100	hiire makrofaagid	<i>AbD Serotec</i>
Ki67	rott	1:200	hiire proliferuivad rakud	<i>eBioscience</i>
OLFM4	küülik	1:100	hiire kiiresti jagunevad maksa eellasrakud	<i>Cloud-Clone Corp.</i>
CD34-Alexa 647	rott	1:100	hiire endoteelirakud	<i>BD Pharmingen</i>
Desmin	kits	1:100	hiire tähttrakud	<i>R&D Systems</i>
Sekundaarsed antikehad	Peremees-organism	Lahjendus	Märklaud	Päritolu
GαR-Alexa 488	kits	1:1000	roti antigeen	<i>Life Technologies</i>
DαR-Alexa 647	eesel	1:1000	roti antigeen	<i>Jackson Immuno Research</i>
DαRb-Alexa 647	eesel	1:1000	küüliku antigeen	<i>Life Technologies</i>
GαRb-Alexa 647	kits	1:1000	küüliku antigeen	<i>Life Technologies</i>
DαG-Alexa 488	eesel	1:1000	kitse antigeen	<i>Life Technologies</i>

GαR = goat-anti-rat; DαR = donkey-anti-rat; DαRb = donkey-anti-rabbit; GαRb = goat-anti-rabbit; DαG = donkey-anti-goat.

Järgmisel päeval eemaldati klaasidelt primaarse antikeha lahus ning pesti koelõike 1x PBS-iga 3 korda 5 min, millele järgnes inkubeerimine sekundaarse antikehaga (Tabel 3) pimedas 1 tund. Seejärel pesti alusklaase 3 korda 5 minutit ning värviti tuumad DAPI lahusega (lõpp-kontsentratsioon 1 µg/ml, *Sigma*) 1x PBS-is. Enne sulundamist *Fluorescent Mounting*

Medium lahusega (*Dako*) pesti alusklaase veel 1x PBS-ga 3 min. Preparaate vaadeldi ja pildistati *Olympus BX51* fluorestsentsmikroskoobiga ning töödeldi *Hokawo* pilditöötluse programmiga.

2.2.7 FACS-analüüs

2.2.7.1 Kasutatud rakuliin

DetectaGeneTM Green CMFDG lacZ Gene Expression Kit'i (*Molecular Probes*) testimiseks rakukultuuris kasutati inimese hepatoomi rakuliini Hep3B (*ATCC*). Rakke kasvatati IMDM (ingl *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, kuhu oli lisatud 10%-lise lõppkontsentratsiooniga veise looteseerumit (FBS, ingl *fetal bovine serum*). Antibiootikume lisati söötmesse järgmiselt: penitsiliini 100 U/ml ja streptomütsiini 0,1 mg/ml. Rakke kasvatati inkubaatoris temperatuuril 37°C ja kasvukeskkond sisaldas 5% CO₂.

2.2.7.2 Hep3B rakkude transfektsioon

Transfektsioonile eelnenud päeval külvati 60 mm läbimõõduga koekultuuri tassile vastavalt 300 000 Hep3B rakku. Transfektsiooniks kasutati β-galaktosidaasi sisaldavat pCG plasmidi, negatiivse kontrollina kasutati tühja pCG1 plasmidi (Tanaka ja Herr, 1990) ning transfektsiooni efektiivsuse määramiseks pEGFP plasmidi. Rakke transfekteeeriti *TurbofectTM* reagentiga. Transfektsioonisegu valmistamiseks lisati kõigepealt DNA-le IMDM-i sellises koguses, mis moodustaks tassil olevast söötimest 1/10 ning seejärel lisati segule 1,66 µl *TurbofectTM* reagenti 1 µg DNA kohta. Transfektsioonisegu segati pipetiga suspendeerides, inkubeeriti 20 minutit toatemperatuuril ning tilgutati tassidele laiali. Seejärel inkubeeriti transfektsiooniseguga tase 2 ööpäeva jooksul 37°C inkubaatoris. Transfektsiooni efektiivsust hinnati 48 tunni möödudes GFP helenduse alusel faaskontrastmikroskoobi (*Nikon Phase Contrast 2 LWD*) abil, mille lisavarustusse kuulus super kõrgrõhu elavhõbedalambi toiteblokk (*Nikon HB-10101AF*), mida oli võimalik rakendada GFP transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks.

2.2.7.3 Transfekteeeritud Hep3B rakkude FACS-analüüs

Transfekteeeritud rakukultuuri tassidelt eemaldati sööde ning pesti 1 ml *Dulbecco's* PBS-iga (DPBS, *Lonza*). Seejärel pesupuhver aspireeriti ning lisati tassidele 0,5 ml trüpsiin-EDTA (etüleendiamiintetraatsetaat) lahust (vastavalt 0,05% ja 0,02%, *Naxo*) DPBS-is, mis võimaldas adheseerunud rakkude suspensiooni viimist. Trüpsiniseeritud rakususpensioonid

tõsteti vastavalt markeeritud 15 ml tuubidesse, kuhu oli eelnevalt lisatud 3 ml IMDM-söödet. Rakkudega tuube tsentrifuugiti 800xg 20°C 5 min, misjärel supernatant aspireeriti. Töötlus *CMFDG Kit*'i komponentidega teostati vastavalt tootjapoolsetele juhistele, kusjuures soovitatavate kemikaalidena testiti komplektis sisalduvate rakupumba inhibiitori *verapamil*'i ja endogeense β -galaktosidaasi inhibiitori *chloroquine*'i koosmõju reaktsiooni efektiivsusele. *CMFDG kit*'i üheks komponendiks on värvitu fluorestseiinil põhinev β -galaktoosi derivaat, mis raku tsütoplasmasse jõudnuna on substraadiks LacZ geenilt ekspresseeritavale β -galaktosidaasi ensüümile, mille tulemusel konverteeritakse värvitu ühend roheliselt fluorestseeruvaks produktiks, mis võimaldab transfekteenud rakkude tuvastamist fluorestsents-aktiveeritaval rakusorteerimise (FACS, ingl *fluorescent activated cell sorting*) meetodil. Peale *CMFDG* töötlust tsentrifuugiti rakke 800xg 4°C 5 min, misjärel supernatant aspireeriti ning lisati 100 μ l surnud rakke märgistavat külma DAPI-lahust (ingl *4',6-diamidino-2-phenylindole*; *Sigma-Aldrich*) DPBS-is lõppkontsentratsiooniga 5 μ g/ml, milles rakusade üles suspendeeriti. Seejärel asetati rakke sisaldavad tuubid jääle ning jätkati elusate rakkude analüüsi *BD FACSAria* rakusorteriga (*BD Biosciences*). FACS-i tulemuste analüüs teostati *FlowJo* programmi abil.

2.2.7.4 Hiirte anesteseerimine

Hiirte anesteseerimiseks kasutati anesteetikumide *Hypnorm* (fentanüültsitraat 0,315 mg/ml; fluanision 10 mg/ml) ja *Dormicum* (midasolaam 5 mg/ml) 1:1 segu, kusjuures kumbki anesteetikum lahjendati enne kasutamist 1:5 ddH₂O-s, ning annustati 10 μ l/g kehakaalu kohta intraperitonaalselt. Anesteesia kestvus oli vähemalt 1 tund.

2.2.7.5 Maksarakkude eraldamine

Anesteseeritud hiired fikseeriti operatsioonilauale ning avati kõhuõõs. Seejärel alustati maksa perfusiooni portaalveeni sisestatud kanüüli kaudu, kusjuures esmase perfusioonivedelikuna kasutati 37°C juures eelsoojendatud etüleen-glükool-tetra-atseethappe (EGTA) lahust, mis sisaldas 125 mM EGTA-d (*AppliChem*) *Krebs-Ringer*'i puhvril (175 mM NaOH, 24 mM NaHCO₃, 20 mM glükoos, 5 mM HEPES pH 7.45, 4,8 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄·H₂O, 1,2 mM KH₂PO₄, mQ; lõplik pH 7.4). Vahetult peale kanüüli sisestamist lõigati läbi maksa alumine õõnesveen, mis oli vajalik vere väljapääsuks. Perfusiooni automatiseerimiseks kasutati tilguti ja voolikuga ühendatud vedelikupumpa (*Pharmacia LKP*) ning perfusioon EGTA-lahusega kestis 5 minutit kiirusel 3-4 ml/min, mis oli vajalik vere eemaldamiseks

maksast. Seejärel jätkati samal kiirusel 10 minuti jooksul perfusiooni 37°C juures eelsoojendatud kollageenaasi lahusega *Krebs-Ringer*'i puhvris, mis sisaldas 1 M CaCl₂ (*Sigma-Aldrich*) ja 0,35 mg/ml kollageenaas II-te (*Gibco*). Kollageenaasi lahuse toime toimub maksa ensümaatilise lõhustamine, mis vabastab elusad maksarakud ekstratsellulaarsete struktuuride küljest.

Peale perfusiooni eemaldati maks ettevaatlikult hiire kõhuõõnest ning asetati 10 mm läbimõõduga koekultuuri tassile, kuhu oli eelnevalt lisatud väikses koguses külma DPBS-i. Seejärel raputati maksakude pinsettide vahel üherakulise suspensiooni saamiseks DPBS-is ning tõsteti 50 ml tuubi kohale asetatud 70 µM nailonfiltrile (*BD Falcon*) ning lasti suspensioonil läbi filtri tuubi liikuda. Tuubi kogunenud rakususpensioon asetati jääle ning jätkati fraktsioneeriva tsentrifuugimisega hepatotsüütide ja mitteparenhümaalsete rakkude eraldamiseks.

Eelkirjeldatud perfusioonil põhinev maksa seedimise meetod töötati roti näitel välja juba 1970ndatel aastatel, mis lubas esmakordselt maksarakkude isoleerimist ja kultiveerimist rakukultuuris (Seglen, 1976).

2.2.7.6 Maksarakkude FACS-analüüs

Hiire maksast kättesaadud rakususpensiooni tsentrifuugiti 2 min 50xg 4°C, millejärgselt tekkis 2 fraktsiooni: sademesse koondunud hepatotsüüdid ja supernatanti jäänud NPC-d. Supernatant koos NPC-dega tõsteti ümber uude 50 ml tuubi ning allesjäänud sademele lisati ~10 ml külma DPBS-i. Puhtamate fraktsioonide saamise eesmärgil korrati tsentrifuugimise ja supernatandi ümbertõstmise protsessi kahel korral. Seejärel tsentrifuugiti NPC-de fraktsiooni veel täiendavalt 5 min 300xg 4°C, mille tulemusel sadenesid seni supernatandis asunud NPC-d tuubi põhja. NPC-de sademelt eemaldati liigne vedelik ning lisati 1 ml *BD Pharm LyseTM* puhvrit (*BD Biosciences*), milles suspendeeriti sade üles ning inkubeeriti erütrotsüütide lüüsimise eesmärgil 10-15 min 4°C. Inkubatsiooniperioodi ajal loendati hepatotsüütide arv vastavas fraktsioonis ning tõsteti 1 miljon rakku vajalikul hulgal väiksematesse 15 ml tuubidesse. Peale NPC-de inkubatsiooni lõppu lüüsipuhvris lisati tuubi ~10 ml külma DPBS-i, tsentrifuugiti rakke 2 min 300xg 4°C, loendati ning tõsteti 1 miljon rakku väiksematesse 15 ml tuubidesse. Kõiki tuube hoiti igal võimalikul hetkel jääl.

Rakkude ümbertõstmise järgselt teostati tsentrifuugimine, kusjuures hepatotsüütide fraktsiooni sisaldavaid tuube tsentrifuugiti 2 min 50xg 4⁰C ning NPC-fraktsioone 2 min 300xg 4⁰C. Peale tsentrifuugimist eemaldati sademetelt supernatant ning lisati tuubidesse 100 µl sooja *William's Medium*'it (*Gibco*). Järgnevalt teostati rakkudega *CMFDG* töötlus, kasutades *CMFDG Kit*'i ning järgides tootjapoolseid juhiseid.

Peale *CMFDG* töötluse etappi rakke tsentrifuugiti ettenähtud pööretel 2 min 4⁰C, misjärel supernatant aspireeriti, lisati 100 µl 1%-list külma veise seerum albumiini (BSA, ingl *bovine serum albumin*) ning blokeeriti pimedas jääl 30 min. Seejärel lisati olemasolevate segude hulka tabelis 4 väljatoodud erinevate Alexa värvidega märgistatud antikehade otsekonjugaadid ja inkubeeriti pimedas jääl 45 min, aeg-ajalt suspendeerides. Inkubatsiooniaja lõppedes lisati igasse tuubi ~5 ml DPBS-i ning tsentrifuugiti suspensioone antud fraktsiooni jaoks ettenähtud pööretel 4⁰C 2 min. Seejärel eemaldati supernatant ning korraldati pesu ja järgnevat tsentrifuugimist veel ühel korral. Peale tsentrifuugimist aspireeriti taaskord supernatant ning lisati sademele 200 µl surunud rakke märgistavat külma DAPI lahust DPBS-is, misjärel jätkati rakkude analüüsi *BD FACSAria* rakusorteriga. Tulemusi analüüsiti ja kompenseeriti *FlowJo* programmi abil.

Tabel 4. Kasutatud FACS-i antikehad.

FACS-i antikehad	Peremees-organism	Lõpp-lahjendus	Märklaud	Päritolu
CD45-PE	rott	1:500	hiire vereloomerakud	<i>eBioscience</i>
CD44-PE	rott	1:400	hiire sinusoidaalsed endoteelirakud	<i>Life Technologies</i>
EpCAM-Alexa 647	rott	1:100	hiire epiteelirakkude adhesioonimolekul	<i>BioLegend</i>
F4/80	rott	1:100	hiire makrofaagid	<i>AbD Serotec</i>
GαR-biotin	kits	1:200	hiire vastane antigeen (F4/80 tuvastamiseks)	<i>Life Technologies</i>
Streptavidin-633	-	1:200	biotiiniga kojugeeritud antikeha (F4/80 tuvastamiseks)	<i>Life Technologies</i>

GαR-biotin = *goat-anti-rat-biotin*.

2.2.8 Kvantitatiivne analüüs

2.2.8.1 RNA eraldamine maksatükist ja DNAasi töötlus

Lämmastikus külmutatud maksatükkidele lisati 1 ml TRIzol'i reagenti (*Ambion*) ning peenestati uhmrinuia (*Schuetz-biotec*) abil võimalikult homogeenseks massiks. Seejärel segati proove 15 sek vortexil ning inkubeeriti toatemperatuuril 3 minutit. Järgnes proovide tsentrifuugimine 12 000xg 15 min 4°C, mille tulemusel eraldus lahus 3 faasiks, millest ülemisse vesifaasi jäi RNA, mis tõsteti uude tuubi ning RNA sadestamiseks segati proov 0,5 ml isopropüülalkoholiga (*BioTop*). Peale alkoholi lisamist tsentrifuugiti proove 12 000xg 10 min 4°C. Seejärel eemaldati supernatant ning pesti RNA sadet 75% etanooliga kahel järjestikusel korral, kusjuures pesude vahel tsentrifuugiti proove 7500xg 5 min 4°C. Peale viimast tsentrifuugi supernatant aspireeriti ning kuivatati RNA sadet toatemperatuuril 5-10 minutit. Osaliselt kuivatatud RNA sade lahustati autoklaavitud mQ-vees, kusjuures täielikuks lahustamiseks inkubeeriti proove veel 10-15 min 55-60°C termostaadis. Seejärel mõõdeti RNA kontsentratsioon spektrofotomeetriga Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific*) ning jätkati RNA proovide DNAasi töötlusega.

RNA proovide puhastamiseks DNA-st kasutati DNAasi töötlust. Reaktsioon viidi läbi 20 µl mahus, mis sisaldas 2 µg RNA proovi (punkt 2.2.7.1), 2 µl MgCl₂ sisaldavat 10x *DNase I* reaktsioonipuhvrit, 2 µl ensüümi *DNase I* (1 u/µl), 0,5 µl *RiboLock* RNAasi inhibiitorit (40U/µl) ning ülejäänud mahus mQ-vett. Reaktsioonisegusid inkubeeriti 30 min 37°C. Seejärel lisati proovidele 1 µl 50 mM EDTA-d ning kuumutati 10 min 65°C. Kõik DNAasi töötluseks kasutatud reagensid pärinesid firmast *Thermo Scientific*.

2.2.8.2 cDNA süntees

DNAasiga töödeldud mRNA põhjal sünteesiti komplementaarne DNA (cDNA). Reaktsioon viidi läbi 20 µl mahus, mis sisaldas 4 µl 5x reaktsioonipuhvrit, 2 µl 10 mM dNTP nukleotiidide segu, 1 µl oligo(dt)₁₈ praimereid, 1 µl *RiboLock* RNAasi inhibiitorit (40 U/µl), 1 µl *RevertAid* pöördtranskriptaasi, 1 µl mQ-vett ning 10 µl eelmises etapis puhastatud RNA-d veelahuses. Negatiivse kontrollina kasutati proove, kuhu lisati revertaasi asemel mQ-vett. Proove inkubeeriti algselt 1 tund 37°C ja siis 5 min 72°C, misjärel proovid jahutati 4°C juures ning hoiustati kuni kvantitatiivse analüüsini -20°C kapis. Kõik cDNA sünteesiks kasutatud reagensid pärinesid firmast *Thermo Scientific*.

2.2.8.3 Kvantitatiivne PCR (qPCR)

LGR5 geeni ekspressiooni kvantitatiivset hulka erinevate kahjustuste korral määrati kvantitatiivse PCR-i abil, mis võimaldab fluorestsentsi järgi kvantitatiivselt hinnata produkti akumulereerumist reaajas. qPCR-i jaoks vajalikud praimerid olid varasemalt disainitud ning telliti firmast *TAG Copenhagen A/S* (Tabel 6). *HPRT1* praimereid kasutati positiivse kontrollina materjali olemasolu hindamiseks ning hulga ühtlustamiseks.

Tabel 6. Kasutatud qPCR-i praimerid. F – pärisuunaline; R – vastassuunaline; bp – aluspaar

Praimerite komplekt	Praimeri järjestus 5' → 3' suunas	Produkti pikkus	Tuvastab
LGR5	F 5'-CCAATGGAATAAAGACGACGGCAACA-3'	128 bp	LGR5 splaissitud geeniprodukt
	R 5'-GGGCCTTCAGGTCCTCAAAGTCA-3'		
HPRT1	F 5'-CAACGGGGGACATAAAAAGTTATTGGGA-3'	158 bp	HPRT1 splaissitud geeniprodukt
	R 5'-TGCAACCTTAACCATTTTGGGGCTGT-3'		

Reaktsioonimaht igas qPCR-i plaadi süvendis oli 10 µl, mis sisaldas 5 µl 2x *SYBR Green I* segu (*Thermo Scientific*), 500 nM mõlemat praimerit ning ligikaudu 100 ng cDNA-d. Reaktsioon viidi läbi 3 korduses vähemalt 2 eraldiseisva hiire maksaprooviga. Analüüs teostati firma *Applied Biosystems 7900 HT* seadmega, kasutades järgnevat qPCR-i režiimi:

Etapid	Temp.	Aeg	
1. Polümeraasi aktivatsioon	95°C	10 min	
2. Denaturatsioon	94°C	15 sek	} 40 tsüklit
3. Praimerite seondumine ja DNA süntees	64°C	30 sek	
4. Dissotsiatsioonifaas:	95°C	15 sek	
	64°C	15 sek	
	95°C	15 sek	

2.3 Tulemused

2.3.1 PFA-perfusioon on efektiivseim maksakoe fikseerimismeetod

Erinevate loomorganitega töös tuleb tihti arvestada, et katse edukus sõltub suurel määral uuritavale koele sobiliku fikseerimismetoodika valikust. Antud uurimustöö seisukohalt oli oluline leida optimaalseim maksakoe fikseerimismeetod, mis oleks üheaegselt resultatiivne nii X-galaktosidaasi töötluse, antikehade detektsioonitundlikkuse kui ka tdTomato fluorestsentsi säilimise seisukohalt. Sobiva fikseerimisprotokolli leidmiseks testiti läbi mitmed erinevad võimalused (vt töö metoodika osas alapeatükk 2.2.4). Katsetuste tulemused on koondatud kokku tabelis 5, mis annab ülevaate kõikide analüüsitud fikseerimismetoodikate mõju kohta eelnimetatud 3 kriteeriumile. Väljavalitud meetodite testimise käigus selgus, et kõikide kriteeriumite seisukohalt saavutatakse parim tulemus maksa fikseerimisel portaalveeni perfusiooni kaudu, mis võimaldab nii koe sise- kui välisstruktuuride hetkelist fikseerumist. Tulemusi antikehade detektsioonivõime osas parandas veelgi koetüki perfusioonijärgne inkubeerimine 30% sahharoosi lahuses. X-galaktosidaasi töötluse efektiivsuse seisukohast oli oluline, et maksatükk viibiks sahharoosilahuses vaid senikaua, kuni kude on saavutanud sukroosi suhtes isotoonilisuse (ehk langenud lahuse põhja), sest ülemääraselt pikk sahharoosis inkubeerimine inhibeeris LGR5-positiivsete rakkude värvingut.

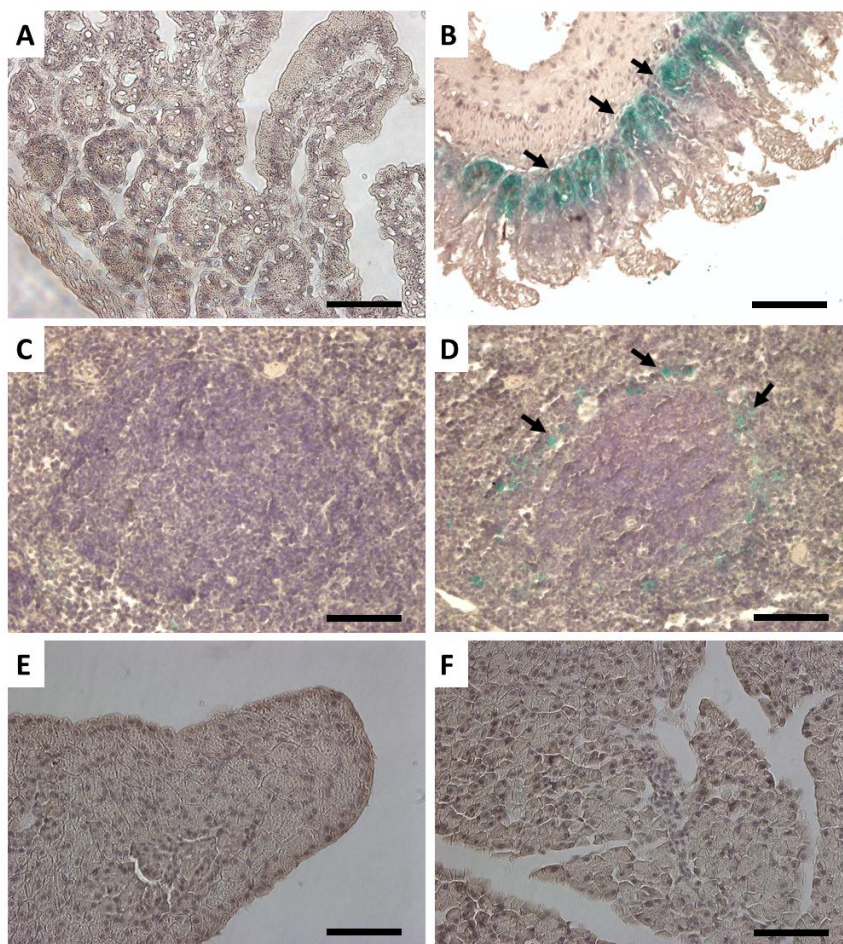
Tabel 5. Maksa fikseerimismetoodika optimeerimine.

Fiksatsioonitüüp	X-galaktosidaasi töötlus	Antikehade detektsioonivõime	tdTomato fluorestsents
Eelfikseerimata maksakude	Ei töötanud	Väga hea	Hea (laiali valguv)
Erineva kestusega (0,5h, 1h, 2h, üleöö) maksakoe eel-fikseerimine PFA-ga	Hea	Halb	Hea
PFA perfusioon + kohene külmutamine	Väga hea	Halb	Väga hea
PFA perfusioon + üleöö inkubatsioon sahharoosi lahuses	Ei töötanud	Väga hea	Väga hea
PFA perfusioon + ca 1-2h inkubatsiooni sahharoosi lahuses	Hea	Hea	Väga hea

Käesolevas töö seisukohalt sekundaarsed koed (peensool, põrn, pankreas) fikseeriti 1-tunnilise inkubatsiooniga 4%-lise PFA-lahuses, millele järgnes kohene külmutamine, kuna antud kudede puhul oli eesmärgiks detekteerida vaid LGR5-positiivseid rakke.

2.3.2 LGR5^{LacZ} süsteemi kontroll peensooles

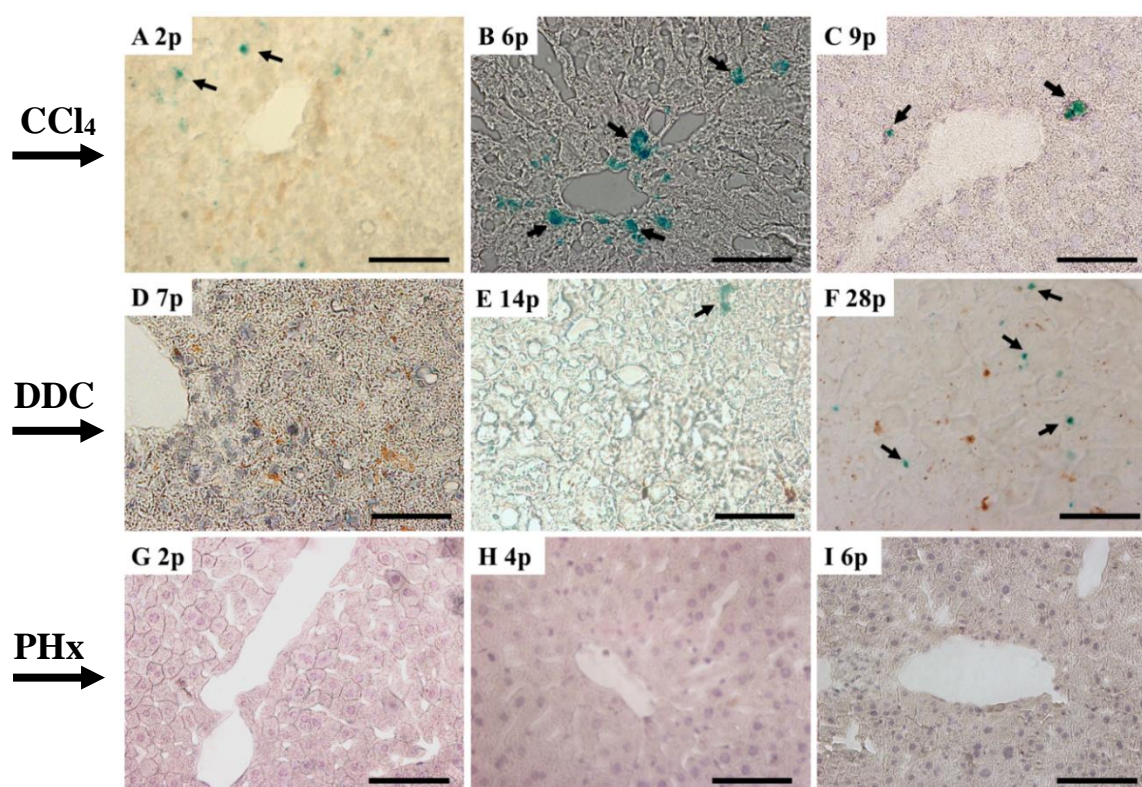
Varasemate uurimustöödega on näidatud, et peensoole krüptide põhjas paiknevad soole igapäevast uuenemist toetavad LGR5-positiivsed tüvirakud (Barker jt, 2007). Seetõttu otsustati kontrollida meie LGR5^{LacZ} genotüübiga hiirte puhul antud reportersüsteemi toimimist esmajärgus just peensooles, mis annaks kindlustunde, et hiirte genotüüp vastab ootustele ning võib jätkata LGR-positiivse populatsiooni kirjeldamisega maksakoes. X-gal töötamise tulemused kinnitasid, et soolestiku krüpti põhjades asuvad rakud värvuvad LGR5^{LacZ} heterosügootsetel kahjustamata hiirtel siniselt (Joonis 7, B). Lisaks soolele prepareeriti antud genotüübiga hiirtel ka maksaga lähedalt seotud organid, põrn ja pankreas, millest esimese puhul oli märgata LGR5-positiivse rakupopulatsiooni olemasolu põrna marginaaltsoonis (Joonis 7, D), mis kujutab endast spetsialiseeritud makrofaagide, dendriit- ja B-rakkude rikast piirkonda. LGR5 markerit ekspresseerivad rakud puudusid aga reporterhiire pankreases kui ka metsiktüüpi hiire sooles, põrnas ja pankreases (Joonis 7, vastavalt F, A, C ja E).



Joonis 7. LGR5^{LacZ} hiirte genotüübi kontroll soole, põrna ja pankrease põhjal. LGR5⁺ rakkude olemasolu detekteeriti nii kahjustamata hiire peensooles kui ka põrnas (vastavalt B ja D), pankreases antud rakupopulatsiooni ei esinenud (F). Paneelidel A (peensool), C (põrn) ja E (pankreas) on näidatud metsiktüüpi hiire vastavate kudede proovid. Nooded osutavad LGR5⁺ rakkudele. Tuumad on värvitud hematoksüliiniga. Mõõtlõik 50 µm.

2.3.3 Kõige rohkem LGR5⁺ rakke tekib maksas CCl₄ kahjustuse korral

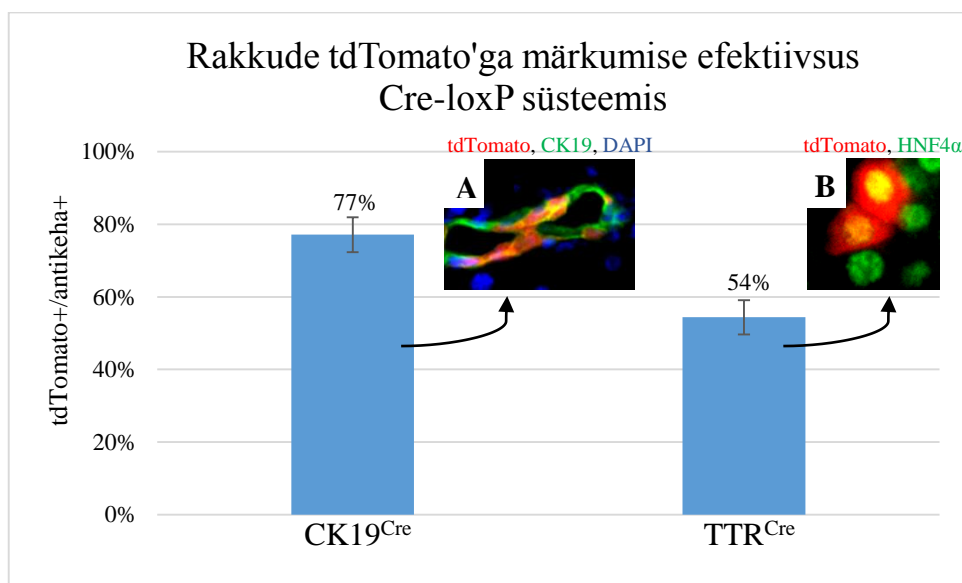
Peensoole analüüsiga selgus, et töös kasutatav LGR5^{LacZ} hiire genotüüp vastab tingimustele ning järgnevalt suunduti maksakoe uuringute juurde. Antud uurimustöös leidis kinnitust juba varasemalt teada fakt, et LGR5-positiivseid rakke LGR5^{LacZ} genotüübiga hiire normaalses maksas ei esine (Huch jt, 2013) (Lisa 3). Selleks, et hinnata, millised kahjustustüübid indutseerivad LGR5⁺ rakkude visuaalse tekke, kasutati 3 erinevat kahjustusmudelit, milleks olid CCl₄, DDC ja PHx kahjustus, ning erinevaid regeneratsiooni- või mõjuperioode (vt meetodeid, Joonis 6). Katsetulemuste põhjal selgus, et kõige selgemalt indutseerib LGR5⁺ rakkude teket maksakoes CCl₄ kahjustus, mida oli võimalik tuvastada igal valitud ajapunktil (Joonis 8, A-C), intensiivseimalt aga 6ndal päeval peale kemikaali süsti (Joonis 8, B). DDC dieedi puhul 7 päeva möödumisel vastavat kemikaali sisaldaval toidul LGR5⁺ rakke ei tuvastatud (Joonis 8, D), kuid 2- ja 4-nädalase kahjustusperioodi järgselt oli märgata üksikute LGR5⁺ rakkude teket (Joonis 8, vastavalt E ja F), mille hulk oli visuaalse hinnangu alusel aga tunduvalt väiksem kui CCl₄ kahjustuse korral. Ainsa kahjustusena ei indutseerinud ühelgi vaadeldud ajapunktil LGR⁺ rakkude teket osaline hepatektoomia (PHx) (Joonis 8, H-J).



Joonis 8. LGR5⁺ rakkude teke pärast erinevaid kahjustusi. LGR5⁺ rakke ei tuvastatud 7 päeva peale DDC dieeti (D) ning PHx kahjustuse korral mitte ühelgi vaadeldud ajapunktil (G-I). Esimesi märke uuritava populatsiooni tekkest detekteeriti 2- ja 4-nädalase DDC dieedi järgselt (E ja F) ning CCl₄ kahjustuse korral nähti LGR5⁺ rakkude olemasolu igas ajapunktis (A-C), intensiivseimalt 6. kahjustusjärgsel päeval (B). Tuumad on värvitud hematoksüliniga (va A, B ja E). Mõõtlõigud 50 µm (B, C, G, E), 75µm (A, D, E) 20 µm (F) ja 100 µm (I).

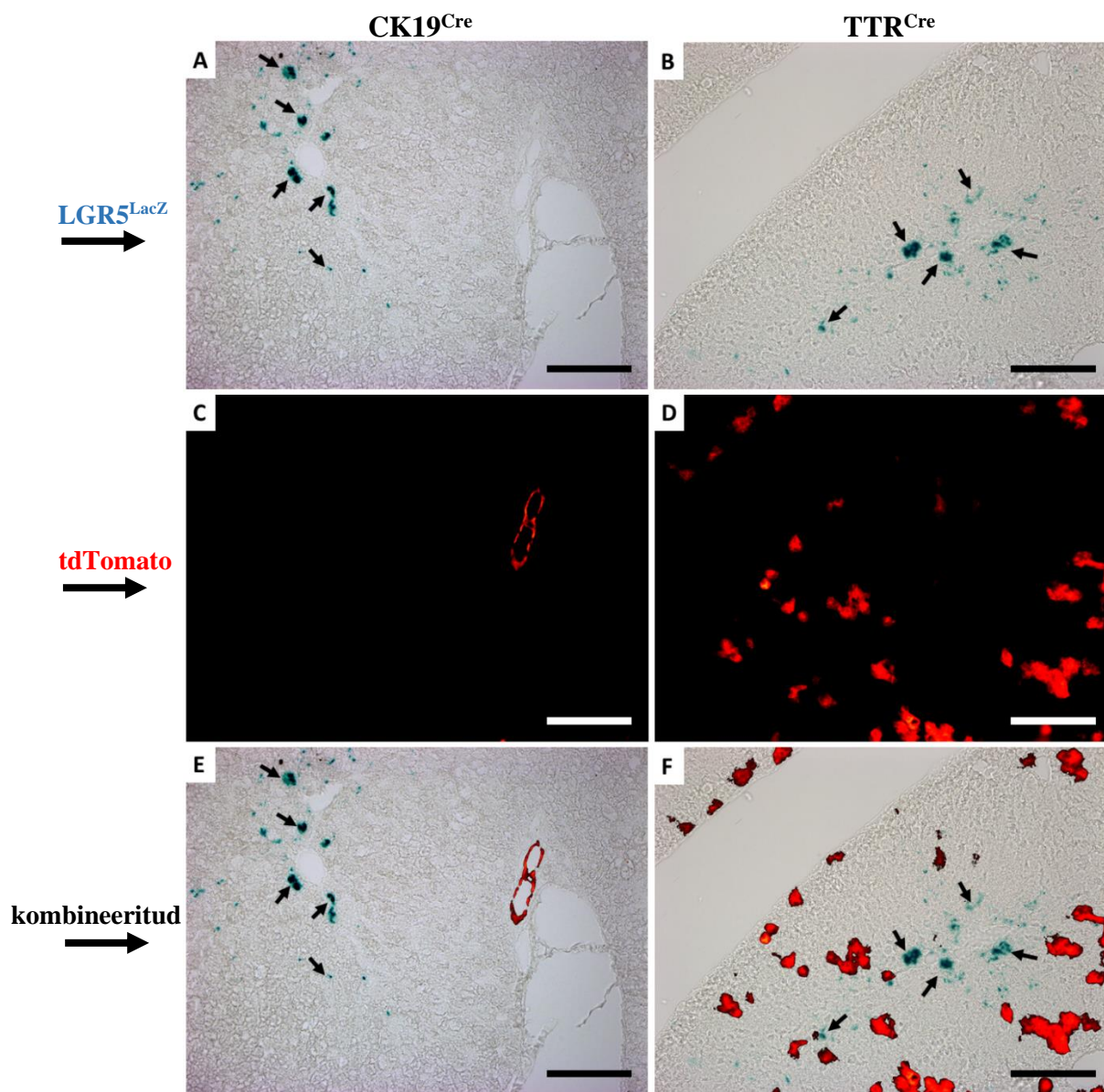
2.3.4 LGR5⁺ rakud ei pärine hepatotsüütidest ega sapiteede rakkudest

Visuaalselt kõige selgemalt tekkisid LGR5⁺ rakud 6ndaks päevaks peale CCl₄ kahjustust, mistõttu jätkati kõnealuste rakkude päritolu uuringuid, kasutades just selle ajapunkti ja kahjustusega hiiri. Sellel otstarbel seati üles LGR5⁺ rakkude päritolu uurimise (*trace*²ingu) katseplaani, mis hõlmas CK19^{Cre} ja TTR^{Cre} genotüübiga hiirtel vastavalt CK19⁺ sapiteede või TTR⁺ parenhümaalsete rakkude märgistamist tdTomato punaselt fluorestseeruva valguga (vt Joonis 5). Sapiteede või hepatotsüütide märkimine saavutati tamoksifeeni korduva manustamisega 3-4 nädalastele hiirtele, mis võimaldas tänu Cre ensüümi aktiveerimisele tdTomato ekspressiooni. Hindamaks Cre-loxP süsteemi efektiivsust ehk sihtmärkrakkude märkimist tdTomato'ga, viidi läbi loendusanalüüs, kus hinnati tdTomato positiivsete rakkude arvu vastavalt kas sapiteede (CK19) või hepatotsüütide (HNF4 α) spetsiifiliste antikehadega värvunud rakkude koguhulka (Joonis 9). Tulemustest selgus, et võrreldes parenhümaalsete rakkudega (Joonis 9, 2. tulp) on sapiteede rakkude (Joonis 9, 1. tulp) märkimine sellise süsteemiga mõnevõrra efektiivsem, kus esimeste puhul märkus tdTomato valguga veidi üle poole ehk 54% hepatotsüütidest ning teiste puhul ligi 77% sapiteede rakkudest.



Joonis 9. Rakkude märkimise efektiivsus Cre-loxP süsteemis. Esimene tulp tähistab tdTomato positiivsete rakkude arvu CK19⁺, teine tulp aga HNF4 α ⁺ rakkude koguhulgast. Graafikul on toodud 15-lt mikroskoobi vaateväljalt kokku loetud rakkude hulk koos standardveaga, kusjuures loenduseks kasutati 3 eraldiseisva hiire koelõike. Illustreerivad pildid näitavad loendatud rakkude visuaalset väljanägemist, kus punase värviga on mõlemal juhul tähistatud tdTomato⁺ rakud ning rohelisega CK19 (A) või hepatotsüütide tuumafaktori HNF4 α (B) vastase antikehaga märkunud piirkonda. Tuumad on värvitud DAPI-ga (A). Mõlemad immuunfluorestsentspildid on tehtud 40x suurendusega.

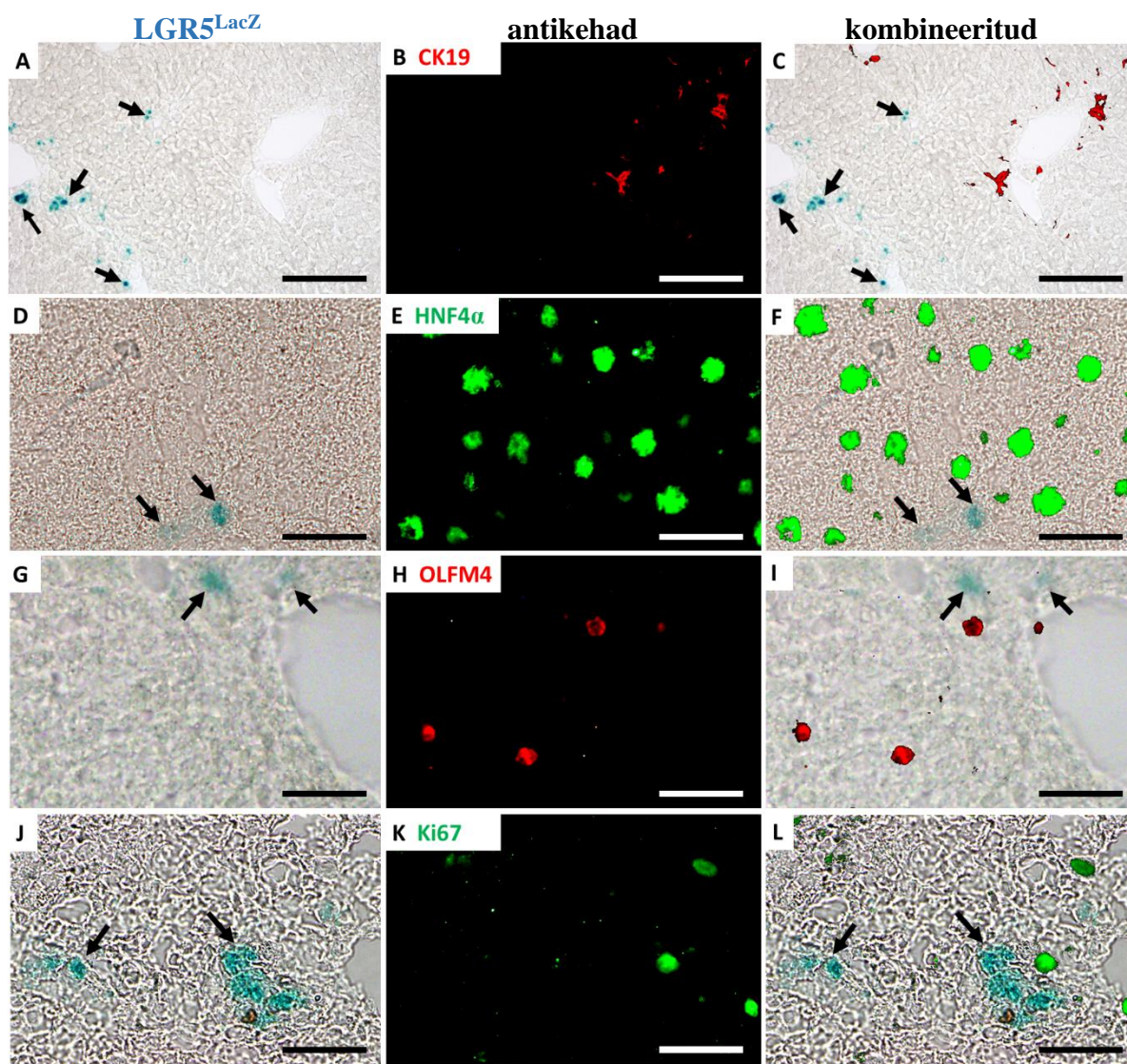
Tracing'u efektiivsuse kindlakstegemise järgselt suunduti edasi LGR5⁺ rakupopulatsiooni päritolu uuringute juurde. Selleks hinnati aktiveeritud Cre-ensüümiga hiirte prepareeritud maksalõikudel tdTomato ja X-gal töötamise tulemusel siniselt värvunud LGR5⁺ rakkude võimalikku asukohalist kattuvust. Olenemata Cre-loxP süsteemi mõõdukast efektiivsusest (Joonis 9), ei suudetud LGR5-positiivsete ja tdTomato'ga *trace*'itud hepatotsüütide või sapiteede rakkude kolokalisatsiooni ühelgi koelõigul tuvastada (Joonis 10, vastavalt F ja E). Pigem kaldusid LGR5-positiivsed rakud paiknema tsentraalveeni läheduses, eemal sapiteid koondavatest portaalladest (Joonis 10, A, C ja E), ning ka tdTomato⁺ parenhümaalsete rakkudega kattuvust ühelgi koelõigul ei detekteeritud (Joonis 10, B, D ja F).



Joonis 10. LGR5⁺ rakkude kolokalisatsiooni hindamine tdTomato abil *trace*'itud hepatotsüütide või sapiteede rakkudega 6 päeva peale CCl₄ kahjustust. Paneelidel A ja B on kujutatud LGR5⁺ rakupopulatsioonid (sinised rakud), paneelidel C ja D vastavad tdTomato⁺ sapiteede rakud ja hepatotsüüdid ning kombineeritud kujutised on välja toodud paneelidel E ja F. Mustad nooled osutavad LGR5⁺ rakkudele. Mõõtlõik 100 µm.

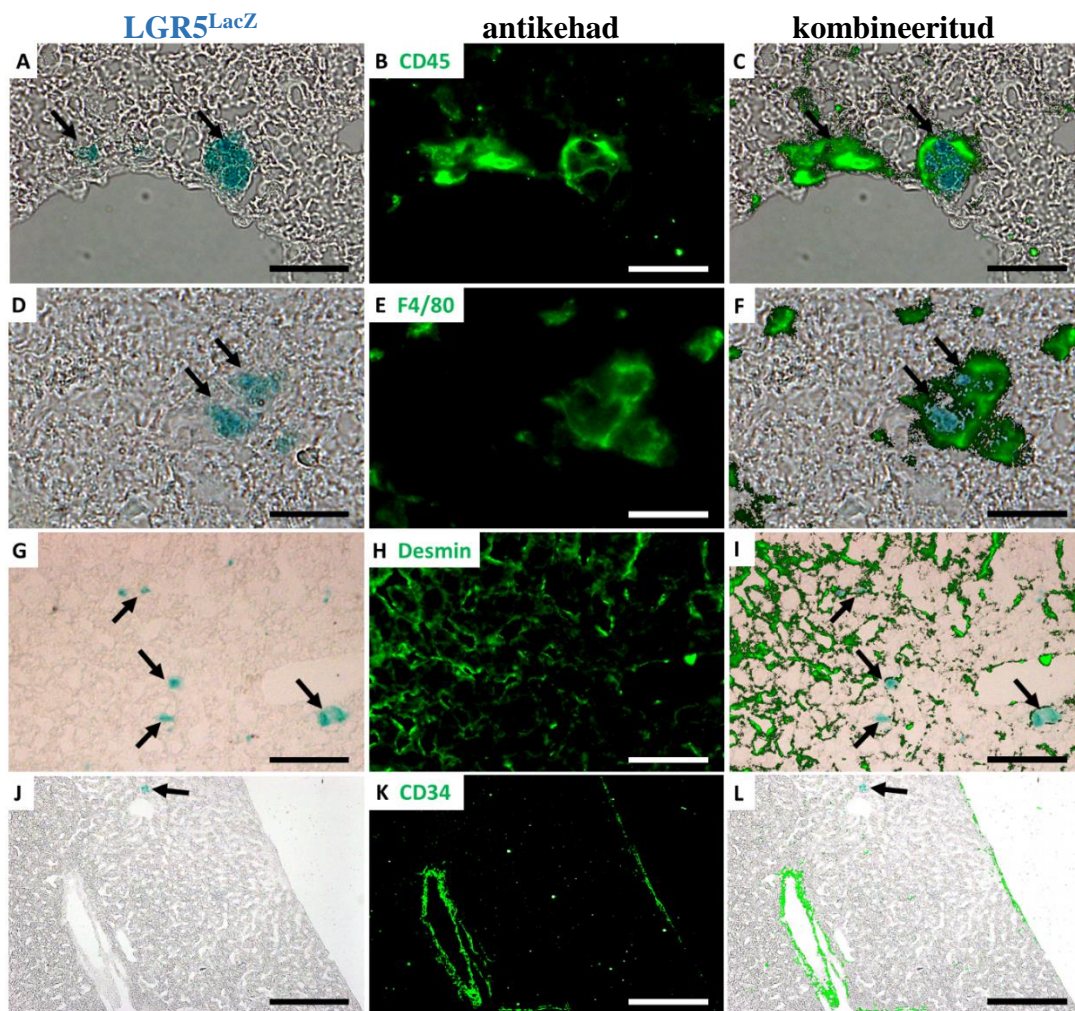
2.3.5 LGR5⁺ rakud on CD45⁺F4/80⁺Desmin⁺HNF4α⁻CK19⁻Ki67⁻OLFM4⁻

Kuna *trace*'ingu tulemused ei andnud loodetavat selgust LGR5⁺ rakkude päritolu kohta, siis otsustati immuunfluorestsentsmeetodi kaasabil antud populatsiooni täiendavalt iseloomustada. Tulemused kinnitasid *trace*'ingu käigus kujunenud arvamust, et LGR5⁺ rakud ei pärine hepatotsüütidest ega sapiteede rakkudest, olles negatiivsed nii HNF4α kui ka CK19 vastaste antikehade suhtes (Joonis 11, vastavalt D-F ja A-C). Lisaks näitas uuritav rakupopulatsioon negatiivsust kiirestijaguneva maksa eellasrakkude markeri OLFM4 ja proliferatsioonimarkeri Ki67 suhtes (Joonis 11, vastavalt G-I ja J-L).



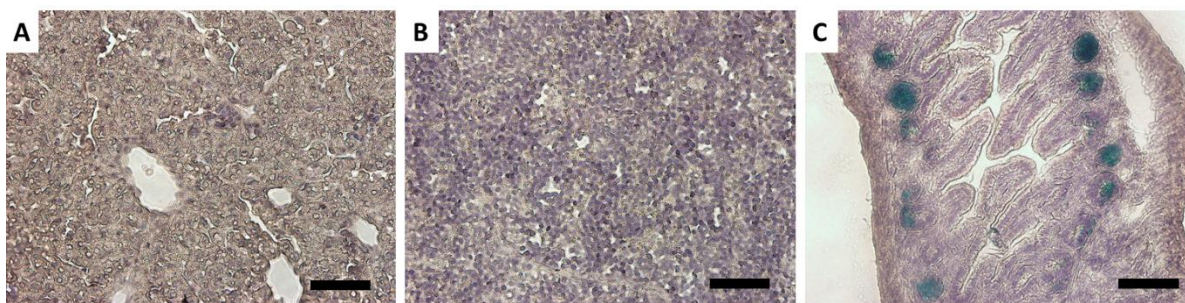
Joonis 11. LGR5⁺ rakkude iseloomustamine immuunfluorestsentsmeetodi abil. LGR5-positiivsed rakud olid negatiivsed portaalalade ümber koondunud sapiteede markeri CK19 (A-C), hepatotsüütide markeri HNF4α (D-F), kiirestijagunevate maksa eellasrakkude markeri OLFM4 (G-I) ja proliferatsioonimarkeri Ki67 (J-L) suhtes. Mustad nooled osutavad LGR5⁺ rakkudele. Mõõtlõigud 80 µm (A-C), 50 µm (B-I), 100 µm (J-L).

Kuna ükski eelpool nimetatud markeritest LGR5⁺ rakkude ekspressioonipaneeli ei kuulunud, siis otsustati testida uuritavat populatsiooni ka mõnede teiste maksas esinevate erineva päritoluga rakutüüpide markerite suhtes. Selleks analüüsiti antud rakkude võimalikku positiivsust tährakkude markeri Desmin'i ning olulise hematopoeetilise organina ka mitmete vereloomerakkudele iseloomulike markerite, seal hulgas vereloomeülese markeri CD45, makrofaagide markeri F4/80 ja endoteelirakkude (ühtlasi ka hematopoeetiliste tüvirakkude) markeri CD34 suhtes. Tulemustest selgus, et suur osa LGR5⁺ rakkudest on positiivsed CD45 ning ka F4/80 markeri suhtes (Joonis 12, vastavalt A-C ja D-F) mis viitab makrofaagidele omastele tunnustele. Osaliselt näitas uuritav populatsioon positiivsust ka markeri Desmin suhtes (Joonis 12, G-I). Samas CD34 markeri ekspressioon oli taandunud portaalaralade piirkonda, mistõttu tsentraalveeni läheduses paiknevate LGR5-positiivsete rakkudega kattuvust ei tuvastatud (Joonis 12, J-L).



Joonis 12. LGR5⁺ rakkude iseloomustamine vererakkude markerite suhtes. Suur osa LGR5 valku ekspresseerivaid rakke olid positiivsed vereloomerakkudele omase markeri CD45 (A-C) ja makrofaagide markeri F4/80 (D-F) ning osaliselt ka tährakkude markeri Desmin suhtes (G-I). LGR5⁺ rakud ei ekspresseerinud endoteelimarkerit CD34 (J-L). Mustad nooled osutavad LGR5⁺ rakkudele. Mõõtlõik 10 µm (A-F) 30 µm (G-I), 100 µm (J-L).

Eelnevatest tulemustest lähtuvalt tekkis huvi järele uurida, kas LGR5⁺ rakupopulatsiooni on võimalik tuvastada ka noore hiire maksas, mil toimub veel aktiivne organi kasv ning vaskulariseerimine. Sellest lähtuvalt valiti katsesse 6 päeva vanused immatuursed hiired, kuid X-gal'i värvinguga ei suudetud eelmainitud vanuses hiirepogade maksas LGR5⁺ rakke detekteerida (Joonis 13, A). Samuti ei olnud LGR5⁺ rakupopulatsioon tuvastatav 6-päevaste hiirte põrnas, peensooles oli aga antud populatsioon selgesti detekteeritav (Joonis 13, vastavalt B ja C).



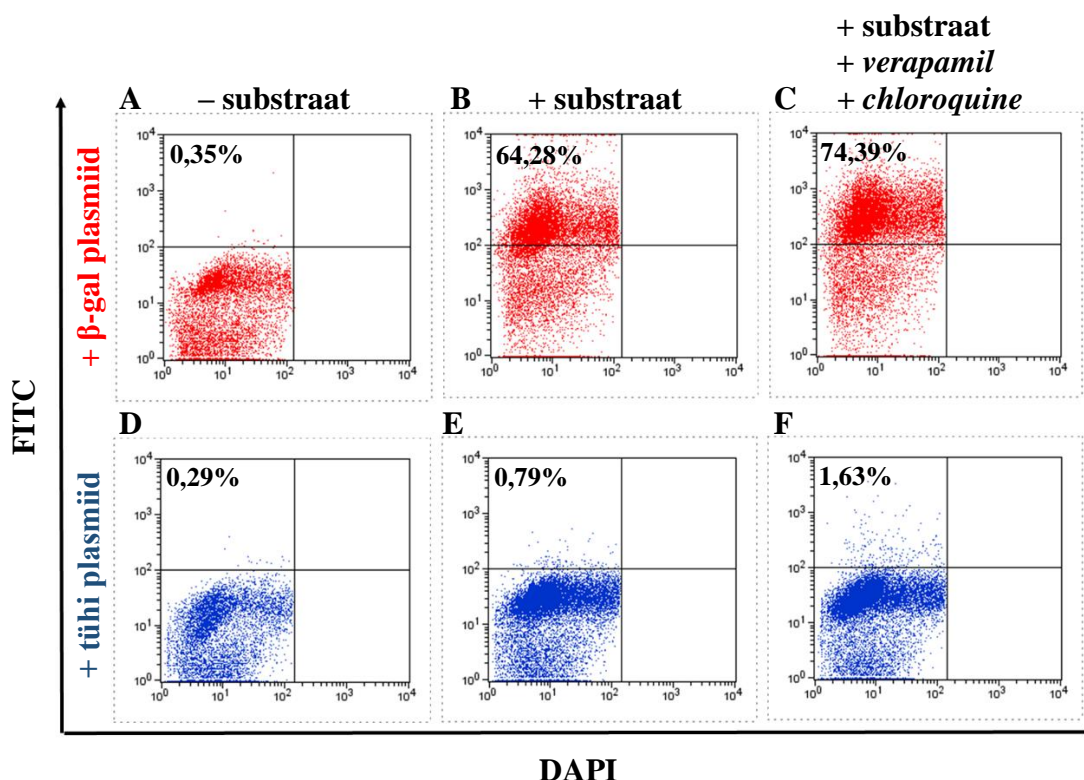
Joonis 13. LGR5⁺ rakkude tuvastamine 6 päeva vanuses hiires. Maksas (A) ega põrnas (B) uuritavat rakupopulatsiooni ei detekteeritud. Peensooles võis näha krüptide põhjas paiknevaid LGR5 markerit ekspresseerivaid rakke (C). Tuumad on värvitud hematoksüliniga. Mõõtlõik 50 µm.

2.3.6 Immuunfluorestsentsanalüüsi tulemuste kinnitamine FACS-analüüsiga

2.3.6.1 CMFDG kit'i test Hep3B rakkudel näitas meetodi usaldusväärsust

Immuunfluorestsentsmeetodiga saadud tulemuste kinnitamiseks peeti oluliseks FACS-analüüsi teostamist, mis võimaldab kvantitatiivselt hinnata erinevaid markereid ekspresseerivate LGR5⁺ rakkude osahulka uuritavas tervikpopulatsioonis. Põhjusel, et olemasolevad LGR5 markerit äratundvad antikehad ei olnud maksakoe histoloogilistel lõikudel kuigi usaldusväärsed, oli vaja põhikatsel eelnevalt kindlaks teha, kas LacZ aktiivsuse alusel töötav CMFDG kit on LacZ-i geeniproducti ekspresseerivate rakkude detekteerimisel tulemuslik. Firma *Molecular Probes* poolt väljatöötatud CMFDG kit võimaldab FACS meetodil tuvastada LacZ reportersüsteemi abil uuritavat rakupopulatsiooni elusraku tasandil. Antud kit'i töömehhanism põhineb värvitu substraadi konverteerimisel fluorestseeruvaks ühendiks (FITC), mis saab toimuda üksnes spetsiifilise ensüümi (LacZ geenilt kodeeritava β-galaktosidaasi) olemasolul süsteemis. Tootja poolt soovitatud protokoll sobivuse hindamiseks kasutati eelkatses inimese hepatoomi rakuliini Hep3B, mida transfekteriti β-galaktosidaasi ekspresseeriva plasmiidiga ning analüüsiti plasmidi sisaldavate rakkude tuvastamisvõimet FACS-il (Joonis 14).

Katse tulemused näitasid, et tootja poolt soovitatud protokoll ei vaja optimeerimist ning võimaldab tuvastada LacZ aktiivsust omavaid elusrakke üsna hästi (Joonis 14, B), samas kui substraadi mittelisisemisel (A) või tühja plasmiidiga transfekteeeritud rakkudes nii substraadi puudumisel (D) kui ka olemasolul (E) tugevat FITC-signaali ei tekkinud. Lisaks selgus, et rakupumba inhibiitori *verapamil*'i ja endogeense β -galaktosidaasi inhibiitori *chloroquine*'i kasutamine parandab detektsiooni efektiivsust ligikaudu 10% (Joonis 14, B vs C).

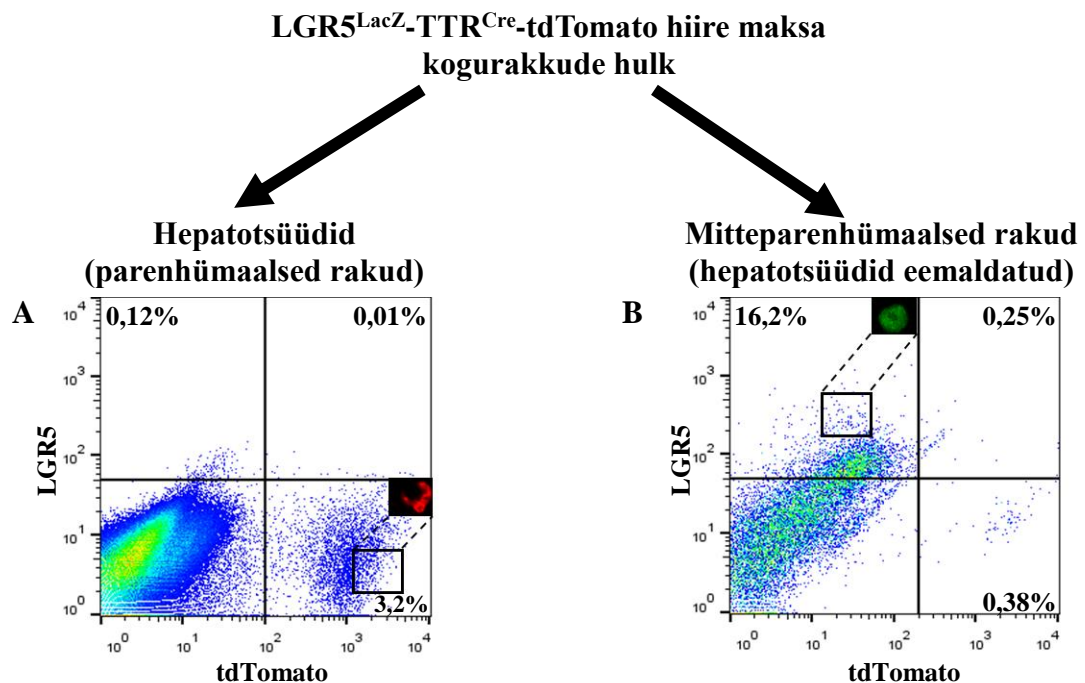


Joonis 14. CMFDG kit'i mõju transfekteeeritud Hep3B rakkudele. Joonise ülemisel real on näidatud β -galaktosidaasiga transfekteeeritud rakkude (punased) poolt emiteeritud FITC-signaali ilma substraadita olukorras (A), substraadi lisamisel (B) ja substraadi lisamisel koos *vera-pamil*'i ja *chloroquine*'iga (C). Alumisel real kujutatud graafikud näitavad tühja plasmiidiga transfekteeeritud rakkude (sinised) vastust CMFDG kit'i töötlusele samades tingimustes: substraadita (D), substraadiga (E) ja substraadi lisamisel koos lisakomponentidega (F).

2.3.6.2 LGR5-positiivsed rakud on CD44⁺CD45⁺F4/80⁺tdTomato⁻EpCAM⁻

Kuna koelõikude histoloogilise analüüsiga ja ka *trace*'inguga jõuti järeldusele, et sapiteede rakud ja LGR5⁺ asuvad üksteisest selgelt eraldatud piirkondades, siis ei peetud vajalikuks FACS analüüsil kinnitada, et tdTomato⁺ sapiteede ja LGR5⁺ rakkude puhul on tegu kahe eraldiseisva populatsiooniga. Sama julget seisukohta ei saanud võtta tdTomato⁺ hepatotsüütide ja LGR5⁺ rakkude teineteist välistavuse suhtes, kuna *trace*'ingu efektiivsus oli vaid veid üle 50% (vt Joonis 9) ning visuaalsel mikroskopeerimise meetodil võib kattuvuse

hindamisel esineda paratamatuid puudujääke. Selle kitsaskoha ületamiseks eraldati $LGR5^{LacZ}$ - TTR^{Cre} -tdTomato genotüübiga hiire maksast nii hepatotsüüdid kui ka mitteparenhümaalsed (NPC) rakud ning testiti FACS-analüüsil antud rakupopulatsioonide positiivsust punaselt helendava tdTomato valgu ja *CMFDG* kit'i töötamise käigus fluorestseeruvaks konverteeritud $LGR5^+$ rakkude suhtes. Hepatotsüütide ja NPC-de eraldiseisval analüüsil selgus, et enamik tdTomato⁺ rakke on tuvastatav hepatotsüütide fraktsioonis (Joonis 15, A), mis on ka loogiline, teades, et tdTomato märgistab TTR^{Cre} hiire puhul parenhümaalseid rakke. Samas $LGR5$ -positiivsete rakkude signaal antud fraktsioonis oli üsna minimaalne. NPC-de populatsioonis oli seisukord vastupidine: tuvastati selge $LGR5$ -positiivsete rakkude signaal, kuid tdTomato tase jäi üsna madalaks (Joonis 15, B).

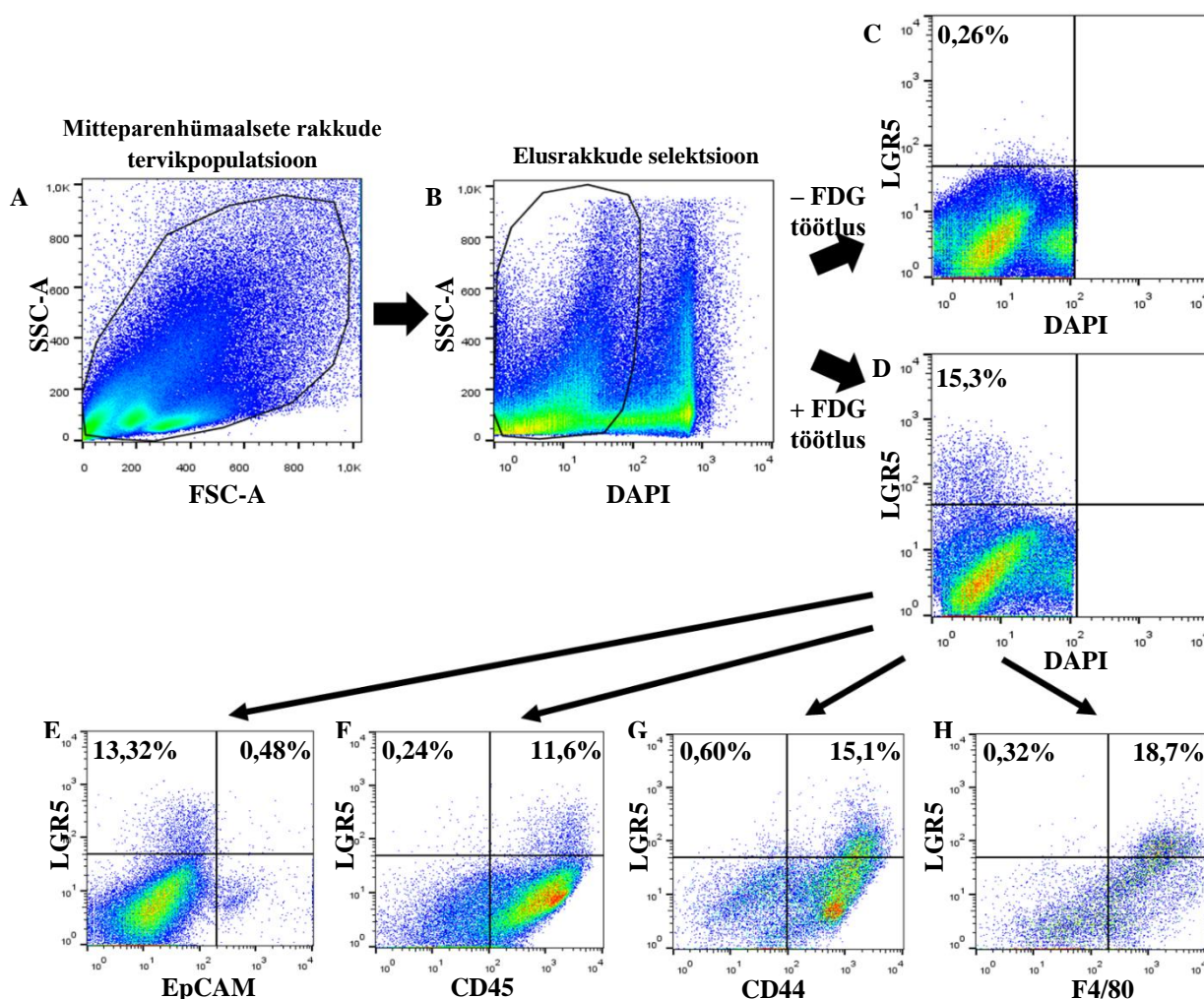


Joonis 15. $LGR5^+$ ja tdTomato⁺ rakkude tuvastamine FACS meetodil. Analüüsiks kasutati $LGR5^{LacZ}$ - TTR^{Cre} -tdTomato heterosügootseid hiiri. Maksast kogutud totaalarakkude hulk lahutati tsentrifuugimisega kaheks eraldiseisevaks fraktsiooniks: hepatotsüüdid ja NPC-d. Hepatotsüütide puhul on näha selgelt detekteeritav tdTomato signaal, kuid üsna puudulik $LGR5$ signaal (A). NPC-de fraktsiooni iseloomustab tugev $LGR5$ signaal, kuid tdTomato⁺ ja $LGR5^+$ tdTomato⁺ topeltpositiivseid rakke tuvastati üsna minimaalsel määral (B).

Eeltoodud FACS-i tulemused andsid selgelt mõista, et $LGR5^+$ rakud kuuluvad mitteparenhümaalsesse fraktsiooni ning *trace*'ingu analüüsi põhjal võib väita, et tegemist pole sapiteede päritolu rakkudega (vt Joonis 10). Neid teadmisi ja ka immuunfluorestsentsmeetodiga saavutatud tulemusi, mis vihjasid $LGR5^+$ rakkude hematopoeetilisele päritolule, arvesse võttes, otsustati uuritavaid rakke testida veel täiendavate markerite suhtes. Kuna

LGR5⁺-populatsioon näitas immuunfluorestsentsanalüüsil positiivset signaali selliste pinna-markerite nagu CD45 ja F4/80 suhtes, siis analüüsiti neid antikehi LGR5⁺ populatsiooni suhtes ka FACS-i abil. Lisaks eelnimetatud markeritele testiti LGR5⁺ rakkude omadusi veel epiteelirakkude adhesioonimolekuli EpCAM ja sinusoidaalsete endoteelirakkude markeri CD44 suhtes, kuna immuunfluorestsentsanalüüsil neid markereid tuvastada ei õnnestunud.

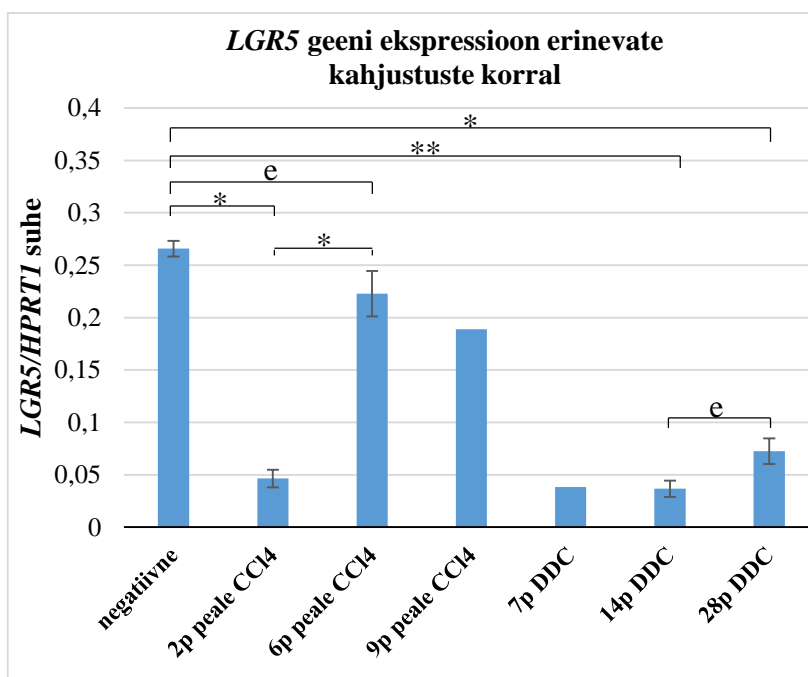
Mitteparenümaalsete elusrakkude analüüsiga selgus, et LGR5-positiivsed rakud on negatiivsed EpCAM-i (Joonis 16, E), kuid positiivsed CD44 markeri (Joonis 16, G) suhtes. Samuti kinnitasid andmed varasema töö käigus selgunud asjaolu, et antud rakud ekspresseerivad ka CD45 ja F4/80 valgumolekule (Joonis 16, vastavalt F ja H).



Joonis 16. LGR5⁺ rakkude iseloomustamine FACS-analüüsil. Maksakoest eraldatud NPC-de fraktsioonist valiti *side* ja *forward scatter* parameetrite alusel uuritav populatsioon (A), millest omakorda selekteeriti edaspidiseks analüüsiks välja elusrakud, mis olid DAPI-negatiivsed (B). Substraadi töötluseta LGR5⁺ rakke ei detekteeritud (C), kuid substraadi lisamisel tekkis selgesti eristatav LGR5⁺ rakupopulatsioon (D). Substraadiga töödeldud rakkude edaspidisel analüüsil selgus, et LGR5⁺ rakud on EpCAM⁻ (E), CD45⁺ (F), CD44⁺ (G) ja F4/80⁺ (H).

2.3.7 *LGR5* geeni ekspressiooni regulatsioon erinevate kahjustuste korral

Lisamaks usaldusväärsust X-gal'i töötuse põhjal kujunenud arusaamale, kuidas üks või teine kahjustus erinevatel ajapunktidel *LGR5* geeni avaldumist tõstab või langetab, teostati antud geeni ekspressioonitaseme kvantitatiivseks määramiseks qPCR-i analüüs. Suureks üllatuseks selgus, et *LGR5* geeni ekspressioon on suurim just kahjustamata normaalse hiire maksas, mida X-gal'i põhine metoodika ei andnud alust arvata (Joonis 17 vs 8). Kuna X-gal'i meetod sellisele ekspressioonitasemele ei viidanud, siis võib arvata, et olulise kontrollvalguna on antud geeni- ekspressiooni regulatsioon keerulisemalt reguleeritud kui seni arvatud. Seega kahjustamata hiire taustal vaadelduna vihjab olukord sellele, et kahjustuse tekitamisel toimub pigem geeni ekspressiooni mahasurumine, mitte induksioon. Samas kinnitas analüüs X-gal'i värvingu abil kujunenud arusaama, et CCl₄ kahjustus indutseerib võrreldes DDC dieediga *LGR5*-positiivse rakupopulatsiooni teket suuremal määral, kus *LGR5* geeni ekspressioon oli kõrgeim 6ndal päeval peale CCl₄ kahjustust (Joonis 17, 3. tulp). Samuti oli näha uuritava geeni ekspressiooni sõltuvust DDC dieedil hoidmise kestusest, kus qPCR-i analüüs viitas tõusvale trendile (Joonis 17, tulbad 5-8), olles kõrgeim hiirtel, keda oli hoitud DDC dieedil testitud ajapunktidest kõige kauem ehk 4 nädalat.



Joonis 17. *LGR5* geeni ekspressiooni analüüs qPCR-i meetodil. Iga graafikul esitatud seisundi andmed on saadud analüüsides vähemalt 2 eraldiseisva hiire *LGR5* geeni-ekspressiooni 3 korduses (va 9p peale CCl₄ ja 7-päevase DDC dieedi korral, millest kummagi korral oli cDNA piisavalt kvaliteetne vaid ühes proovis). Alustades kõige vasakpoolsemast tulbast, on graafikul esitatud *LGR5* geeni ekspressioonitase negatiivsel hiirel, seejärel 2, 6 ja 9 päeva peale CCl₄ kahjustust ning ajapunktidest, kus oli hiiri hoitud kas 7, 14 ja 28 päeva DDC-rikkal dieedil. Ekspressioonitasemed on standardiseeritud *housekeeping* geeni *HPRT1* suhtes, tulemused on esitatud koos standardveaga. * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$; e – ebaoluline.

2.4 Arutelu

Maks on huvitav organ, mille ulatuslik regeneratsioonivõime on teadusmaailmas olnud üsna pikalt populaarseks uurimusobjektiks. Selle fenomeni taga on arvatud paiknevat täiskasvanud tüvirakkude populatsiooni, mis kõlab maksa suure regeneratsioonivõime selgitamise mehhanismina küll üsna loogilisena, kuid kõik senised püüded antud rakke isoleerida on olnud ebaedukad. Paralleelselt tüvirakkude otsingutega on püstitatud mitmeid uusi ja alternatiivseid hüpoteese, mis on näidanud teed pigem selles suunas, et maksas ei pruugi kahjustuse korral klassikalist koeomaste tüvirakkude vahendatud regeneratsiooni toimudagi. Selle asemel on tänaseks suudetud tõestada, et maksa põhirakkudel, hepatotsüütidel ja sapiteede rakkudel, on võime vajadusel transdiferentseeruda teine teises suunas (Furuyama jt, 2011; Limaye jt, 2010; Michalopoulos jt, 2005; Watanabe jt, 2008). Samas ei ole selle mehhanismiga seletatav maksa regeneratsioon suuremate kahjustuste korral, kus rakkude transdiferentseerumise funktsioon on inhibeeritud. Lisaks on arvamusi, et maksa regeneratsioon võiks ka toimuda organiväliste hematopoeetiliste tüvirakkude kaasabil, millel on näidatud võimet diferentseeruda hepato-tsüütideks (Lagasse jt, 2000), mida on aga seni peetud liialt aeglaseks protsessiks, et kogu regeneratsioon võiks olla ainult selle mehhanismiga seletatav (Cantz jt, 2004; Kanazawa ja Verma, 2003; Wagers jt, 2002). Samas põhjanevate tulemuste puudumise taustal ei ole täielikult minetatud ka alalise tüvirakkude reservuaari olemasolu maksakoes, kuid selliste rakkude uuringuid tõkestavaks asjaoluks on sageli sobivate markerite puudumine.

Teiste kudede, näiteks peensoole ja naha, uuringutes on aga viimasel ajal esile kerkinud üsna usaldusväärne täiskasvanud tüvirakkude spetsiifiline marker LGR5 (Barker jt, 2007; Jaks jt, 2008). Antud markerit ekspresseerivaid rakke on uuritud ka maksas ning avastatud, et LGR5⁺ rakud ilmuvad maksakoesse vaid kahjustuse korral ning on tüvirakkudele omaselt pikaajalised (Huch jt, 2013). Samas ei ole tänaseks päevaks ilmunud antud rakupopulatsiooni kohta täiendavaid andmeid, mistõttu puudub endiselt informatsioon selle kohta, milline on nende rakkude päritolu ning kas kahjustuse tingimustes on võimalik lugeda kogu maksa regeneratsiooni üksnes nende rakkude arvele.

Käesolevas magistritöös kajastatud projekti eesmärgiks oli välja selgitada LGR5-positiivsete rakkude päritolu ning neid täiendavalt iseloomustada. Varasema uurimustöö põhjal on teada, et LGR5^{LacZ} reportersüsteemi kasutamisel ei ole kahjustamata normaalse hiire maksas LGR5⁺ rakud tuvastatavad, kuid on näidatud nende ilmnemist CCl₄ ja DDC kahjustuste korral (Huch

jt, 2013). Ka antud uurimustöö käigus kogutud andmed olid neid seisukohti toetavad, kuna LGR5⁺ rakkude olemasolu nähti vaid pärast eelnimetatud kahe kahjustuste tekitamist (Joonis 8). Käesolevas töös testiti veel kolmandatki kahjustuste tüüpi, milleks oli osaline hepatektoomia (PHx), kuid selline koemassi vähendamine LGR5⁺ rakkude teket ei indutseerinud (Joonis 8). Erinevalt 2 eelmisest kahjustusest ei ole PHx-i puhul tegu maksarakkude jaoks toksilise kahjustusega, millega ei kaasne rakkude massilist apoptoosi, põletikulist reaktsiooni ega koe hüpooksiat (Ding jt, 2010; Sydor jt, 2013). Seega võib eeldada, et koe 70%-lisel eemaldamisel on koe mass suuteline enda põhirakkude või muu mehhanismi varal iseseisvalt taastuma, mistõttu ei ole energeetiliselt kasulik täiendavate abijõudude, sealhulgas LGR5⁺ rakupopulatsiooni, aktiveerimine. CCl₄ ja DDC puhul on aga tegu tugevate keemiliste kahjustustega, mis häirivad maksa põhirakkude funktsioone sedavõrd tugevalt, et ilma abistavate rakkudeta antud olukorras toime ei tulda, mida ilmestab ka LGR5⁺ rakkude ilmumine koestruktuuridesse.

Omades kinnitavaid teadmisi kahjustustüüpide kohta, mis indutseerivad uuritava rakupopulatsiooni teket, jätkati antud rakkude päritolu uuringuga. Päritolu uuringutesse kaasati vaid 6 päeva peale CCl₄ kemikaali manustamist eutaniseeritud hiired, kuna nende puhul oli LGR5⁺ rakkude arv koelõikudel visuaalse hinnangu alusel kõige suurem (Joonis 8). Seetõttu peeti selliselt kahjustatud hiirte puhul põlvnemise tuvastamise tõenäosust kõige efektiivsemaks. Rakkude päritolu uurimiseks seati üles hoolikalt läbimõeldud katseplaan, mis võimaldas samaaegselt LGR5^{LacZ} reportersüsteemi kasutamisega jälgida ka hepatotsüütide või sapiteede päritolu rakke ning nende tulevase põlvkondi Cre-loxP mehhanismi abil toimiva tdTomato fluorestsentsi alusel (Joonis 5). Paraku jäi antud meetodiga LGR5⁺ rakkude põlvnemise küsimus veel endiselt lahtiseks, kuna *tracing*'u analüüsiga ei suudetud näidata uuritavate rakkude kolokalisatsiooni CK19⁺ sapiteede rakkude ega ka TTR⁺ parenhümaalsete rakkudega (Joonis 10). Koe histoloogilise ehituse vaatlustulemused andsid mõista, et LGR5⁺ rakud paiknevad pigem tsentraalveeni läheduses, eemal CK19⁺ portaalaladest ning kuigi TTR⁺ rakud paiknesid hepatotsüütidele omaselt hajusalt üle terve koe, siis kippusid LGR5 markerit ekspresseerivad rakud neist siiski eemale või nende vahele asetuma. Hilisema FACS-analüüsiga leidis kinnitust, et tdTomato'ga *trace*'itud hepatotsüüdid asuvad peaaesjalikult parenhümaalses fraktsioonis, samas kui LGR5-positiivsete rakkude signaal tuvastati ennekõike mitteparenhümaalsete rakkude hulgas (Joonis 15). Seega ei toetanud *tracing*'u analüüsi tulemused loodetud hüpoteesi LGR5⁺ rakkude pärinemise kohta hepatotsüütidest või sapiteede rakkudest.

Selle teadmise baasil jätkati LGR5⁺ rakkude täiendavat iseloomustamist lisamarkeritega. Immuunfluorestsentsanalüüsi tulemusel selgus, et uuritav rakupopulatsioon ei ekspresseeri HNF4 α , CK19, OLFM4, Ki67 ja CD34 markereid, kuid on positiivne vereloomeülese markeri CD45 ning makrofaagide spetsiifilise markeri F4/80 suhtes (Joonised 11 ja 12). Osaliselt ekspresseerisid rakud ka tähttrakkude markerit Desmin (Joonis 12). Selline ekspressioonimuster lükkas kooskõllaliselt *tracing*'u analüüsiga ümber senise hüpoteesi LGR5⁺ rakkude põlvnemiskäigust, vihjates hoopiski uuritava rakupopulatsiooni hematopoeetilisele päritolule. Tulemusi kinnitas FACS-analüüs, millega õnnestus tuvastada veel LGR5⁺ rakkude positiivsus sinusoidaalsete endoteelirakkude markeri CD44 suhtes (Joonis 16). Antud tulemused seavad mõneti kahtluse alla LGR5⁺ rakkude tüvirakulisuse, kuna hematopoeetiliste markerite ekspressioon tekitab paratamatult võimaluse, et tegemist on vaid keemilise kahjustuse korral aktiveeritavate vereloomerakkudega, mis osalevad immuunvastuse kujunemises. Varasemalt on teada, et maksaspetsiifilised makrofaagid on võimelised sekreteerima Wnt ligande, et indutseerida vastava kaskaadi aktivatsiooni ja regeneratsiooni läheduses paiknevates maksarakkudes (Boulter jt, 2012). Seetõttu ei ole võimatu, et makrofaagid ekspresseerivad ka Wnt signaaliülekannet võimendavat LGR5 retseptorit, mis on neile endale tagasisidestusena vajalik komponent, et vigastusest taastumise protsessi vastavalt vajadusele efektiivsemalt suunata ning mitte ülereageerida. Samas ei pruugi olla ka välistatud võimalus, et antud rakud kujutavad hoopiski hematopoeetilist tüvirakupopulatsiooni, mis kahjustuse käigus aktiveerub ning osaleb koe taastamisprotsessis, kuigi hematopoeetilisi tüvirakke iseloomustatakse sageli ka CD34 markeri ekspressiooni alusel (Sato jt, 1999), mida LGR5⁺ rakud immuunfluorestsentsmeetodi põhjal ei ekspresseerinud (Joonis 12). Täiendavad funktsionaalsed uuringud on vajalikud selgitamaks uuritava rakupopulatsiooni rolli keemiliselt kahjustatud maksakoes.

Antud tulemustest lähtuvalt uuriti ka LGR5-positiivsete rakkude olemasolu arenevas hiire maksas, kus kõikide eelduste kohaselt toimub veel aktiivne koe kasv ning vaskularisatsioon. Eeldusel, et LGR5-positiivsed rakud osalevad kahjustatud koe veresoonte tekkes, oleks pidanud nägema antud populatsiooni esinemist ka noore hiire maksas. Selline hüpotees ei leidnud aga kinnitust, kuna antud rakke maksast ei tuvastatud (Joonis 13). Samuti ei detekteeritud sellise rakupopulatsiooni olemasolu noore hiire põrnas, erinevalt täiskasvanud hiirest, kus LGR5-positiivsed rakud olid selgelt tuvastatavad põrna marginaaltsoonis (Joonis 13 vs 7). Antud tulemused viitavad sellele, et nii maksa kui ka põrna normaalse generatsiooni käigus LGR5⁺ rakud ei osale, omades spetsiifilisemat ülesannet just täiskasvanud hiire kudedes.

Käesoleva magistritöö viimaseks eesmärgiks seati analüüsida *LGR5* ekspressioonitaseme muutusi erinevate kahjustuste tingimustel, millega loodeti kinnitada histoloogilistel vaatlustel kujunenud nägemust, millal ja kui kõrgel tasemel on antud geen erinevate kahjustuste korral ekspresseeritud (Joonis 8). Selleks teostati qPCR-i analüüs, kuid saadud tulemused olid taaskord üllatavad (Joonis 17). Nimelt selgus, et kahjustamata hiire maksas on *LGR5* geen kõige tugevamalt ekspresseeritud, millele ei vihjanud mitte kuidagi varasemate uuringute ega ka käesoleva töö tulemused, kasutades *LGR5^{LacZ}* reportersüsteemi (Lisa 3). Seega viitavad tulemused sellele, et kahjustuste korral toimub võrreldes kontrollhiirega hoopis antud geeni allareguleerimine, mitte ekspressiooni suurenemine nagu seni arvatud. Samas näitas *LGR5* geeni ekspressioon ootuspäraseid trende CCl₄ ja DDC kahjustuse korral, kus CCl₄ puhul oli ekspressioon suurim 6ndal päeval peale kahjustust ning DDC puhul oli ekspressiooni tõusu näha sõltuvuses kahjustuse mõjuperioodi kestusest, olles kõrgeim 4-nädalase DDC dieedi korral (Joonis 17). Antud tulemused viitavad sellele, et *LGR5* geeni ekspressioon on maksas keerulisema mehhanismiga reguleeritud kui seni arvatud. Selline regulatsioon võiks olla seletatav näiteks negatiivse tagasiside mehhanismiga translatsiooni tasemel. Võib eeldada, et *LGR5* puhul on tegu väga olulise kontrollvalguga, mille mRNA taset on vaja ootamatute ebasoodsate sündmuste (nagu koe kahjustus) kiireks ületamiseks pidevalt ka kahjustamata maksas kõrgel hoida, kuid translatsiooni mRNA-lt ei toimu. Edasi võiks spekuloida, et valgu mittetootmise põhjuseks võib olla *LGR5* mRNA liigselt suur ebastabiilsus või translatsiooni inhibitsioon lisafaktorite poolt. Samas kahjustuse korral indutseeritakse mRNA-lt valgu süntees ning saadav produkt võib iseenda mRNA sünteesi suhtes käituda negatiivse regulaatorina, mistõttu mRNA-d juurde ei sünteesita, kuid valgu tase saab tõusta tänu varem valmis-sünteesitud mRNA olemasolule rakus. Eelkirjeldatud negatiivse tagasisidestusega potentsiaalne mehhanism *LGR5* geeni ekspressiooni regulatsioonile vajab kindlasti täiendavat uurimustööd ning hüpoteesi kinnitamist.

Antud uurimustöö tulemused viitavad peaaesjalikult sellele, et sageli alatähtsustatakse kudede uuringus vereloome rolli koe terviklikus funktsioneerimises ja ka regeneratsioonis. Liialt rutakalt kiirustatakse vähese tõestusmaterjali põhjal tegema suuri järeldusi. Teadlaste katkematu ambitsioon identifitseerida suure rakendamispotentsiaaliga tüvirakke paneb tihti faktidest mööda vaatama või alternatiivsetesse variantidesse mitte süvenema. Ka käesolevas töös uuritud maksa *LGR5⁺* populatsiooni võib pidada üheks analoogseks näiteks, kus tüvirakulist päriolu on peetud identifitseerimishetkest alates suuresti iseenesestmõistetavaks, kuid mida toetava uurimismaterjali hulk on endiselt vähene ning hüpoteesi usaldusväärsus

põhjapanevate uuringutega kinnitamata. Antud magistritöö tulemustest selgus, et LGR5 markerit ekspresseerivad rakud ei pärine maksa põhirakkude, hepatotsüütide ega sapiteede rakkude hulgast, vaid tulemused viitasid pigem rakkude hematopoeetilisele päritolule. Nagu eelpool mainitud, siis uuritava rakupopulatsiooni funktsionaalsuse tuvastamiseks ja päritolu konkreetsemaks määramiseks on vajalikud veel täiendavad katsed, mis lubaksid teha julgemaid järeldusi LGR5⁺ rakkude päritolu ja rolli kohta maksakoes. Näiteks võiks töösse rakendada maksaspetsiifiliste makrofaagide ehk Kupfferi rakkude pikaajalist jälgimist võimaldava Cre-hiireliini. Taoline lähenemine võimaldaks tuvastada maksakahjustuse korral ilmnevate LGR5⁺ rakkude potentsiaalset päritolu makrofaagidest, millele ka käesoleva töö andmed viitavad. Uuritavate rakkude funktsionaalse rolli selgitamiseks on kavas teostada LGR5⁺ elusrakkude väljasortimine makrofaagide spetsiifilise F4/80 markeri alusel, et otsesemalt hinnata antud rakutüübi diferentseerumispotentsiaali koekultuuris. Seega võib sortimisanalüüs kujuneda kasulikuks vahendiks LGR5⁺ rakkude tüvirakuliste omaduste väljaselgitamisel.

KOKKUVÕTE

Maksa ulatuslikku regeneratsioonivõimet ning antud protsessis osalevaid rakke on järjepanu uuritud, kuid põhjapanevate uurimustulemusteni pole veel seni suudetud jõuda. Üsna uueks uurimisobjektiks antud valdkonnas on kujunenud LGR5 markerit ekspresseeriv raku-populatsioon, millel loodetakse sarnaselt teiste kudedega leida somaatiliste tüvirakkude spetsiifilisi omadusi. Käesoleva uurimustöö eesmärgiks oli uurida LGR5-positiivsete rakkude päritolu ning täiendavalt kirjeldada antud rakkude ekspressioonimustrit.

Uurimustöö käigus:

- leiti optimaalseim maksa perfusioonil põhinev koe fikseerimismetoodika, mis võimaldas uurida LGR5⁺ rakkude päritolu maksa külmlõikudel.
- kinnitati varem teadaolevat asjaolu, et LGR5⁺ rakud on LGR5^{LacZ} genotüübiga hiirte maksas detekteeritavad vaid keemiliste kahjustuste korral (CCl₄, DDC). Uue teadmisenähtuse ilmnemine, et uuritavaid rakke osalise hepatektoomia korral ei teki.
- seati üles plaan LGR5⁺ rakkude põlvnemisanalüüsi teostamiseks, integreerides omavahel LGR5^{LacZ} reportersüsteemi ning hepatotsüütide ja sapiteede rakkude spetsiifilist jälgimist võimaldava meetodika, mis põhines Cre-loxP laialtkasutatud rekombinatsioonitehnoloogial. Antud analüüsi tulemused näitasid, et LGR5⁺ raku-populatsioon ei pärine kummastki testitud spetsialiseeritud rakutüübist.
- identifitseeriti immuunfluorestsents- ja FACS-metoodika abil LGR5⁺ rakkude positiivsus nii vereleomeülese markeri CD45, makrofaagide markeri F4/80 kui ka sinusoidaalsete endoteelirakkude markeri CD44 ekspressiooni suhtes, mis viitas uuritavate rakkude hematopoeetilisele päritolule.
- analüüsiti *LGR5* geeni ekspressioonitasemeid erinevate keemiliste maksakahjustuste korral qPCR-i meetodil, mille tulemustest mõnevõrra üllatuslikult selgus, et *LGR5* geeni ekspressioon on kõrgeim kahjustamata hiire maksas, mida LGR5^{LacZ} reportersüsteemi andmete põhjal järeltada poleks saanud. Kahjustamata hiire *LGR5* geeni ekspressiooni taustal vaadelduna vihjasid tulemused pigem ekspressiooni allareguleerimisele erinevate maksakahjustuste korral, mis kokkuvõttes andis mõista, et antud geeni ekspressioon on rakkudes keerulisemalt reguleeritud kui seni arvatud, mis vajab kindlasti edaspidist uurimist.

Seega täiendas antud uurimustöö seniseid teadmisi maksa LGR5⁺ rakkudest ning andis mitmeid uusi juhtnööre, millest järgnevatel uuringutel lähtuda.

Identification of the Origin of LGR5 Expressing Cells Upon Liver Damage

Kadi Lõhmusaar

SUMMARY

Liver is one of the central organs in a mammalian organism with an enormous regenerative capacity. Intensive studies have been carried out for studying the cellular mechanisms of liver regeneration, yet this process is still not fully understood. One of the newest study objects in this field are LGR5 expressing cells as potential adult liver stem cells. This is strongly suggested by findings from other regenerative organs, including intestine and hair follicle.

The aim of the present study was to identify the origin of the LGR5⁺ cells upon liver damage and characterize their expression pattern more thoroughly. Firstly, we confirmed previously known phenomenon that LGR5⁺ cells appear in liver tissue only upon chemical injury introduced by CCl₄ or DDC administration, but not following partial hepatectomy, the latter being a new discovery.

Next we hypothesized whether LGR5⁺ cells could originate from either hepatocytes or biliary epithelial cells. For this purpose simultaneous use of a LGR5^{LacZ} reporter assay and a tracing method based on Cre-loxP recombination technology were applied. The results indicated that the studied cell population do not appear to originate from either of the two tested cell types. Immunofluorescence and FACS analysis were used to characterize the studied cell population more thoroughly. It was revealed that liver LGR5⁺ cells stain positive for pan-hematopoietic marker CD45, macrophage specific marker F4/80 and sinusoidal epithelial cell marker CD44. Such expression pattern suggest the hematopoietic origin of the LGR5⁺ cells.

The changes in *LGR5* gene expression levels following different injuries were studied using qPCR application. Suprisingly, the results indicated the highest expression level in normal undamaged liver, which was not in accordance with earlier data gained from LGR5^{LacZ} reporter assay, showing the emergence of these cells only following chemical injuries.

The present study revealed several new properties about liver LGR5⁺ cells, yet further studies are required to determine the exact origin and functional role of LGR5⁺ cells during liver regeneration.

TÄNUSÕNAD

Käesolev magistritöö on valminud tänu mitmete kolleegide ja sõprade suurele toele, abile ja heale nõule. Suurimat tänu väärivad minu kaks põhijuhendajat. Tänan enda labori eestvedajat Viljar Jaksi väga elulise ja kaasahaarava projekti usaldamise eest minu kätte. Tänan, et leidsid kõige kiirematel hetkedel aega minuga maha istuda ja protokolle viimistleda ning ka rohkete teemakohaste ja -väliste toredate vestluste eest. Tänan, et suutsid näha minu sagedastes näiliselt negatiivsetes tulemustes positiivseid sõnumeid, millega mind pidevalt motiveerida. Õpetasid mulle, et huvitava hüpoteesi püstitamine on küll oluline projekti algatamises, kuid ka heasse teooriasse tuleb osata veidi skeptiliselt suhtuda.

Suured tänusõnad ka minu teisele juhendajale Janeli Viilile. Tänan, et olid ikka ja alati minu katsete käekäigust huvitatud ning esimeseks näpunäidete andjaks uute meetodite omandamisel. Tänan, et jätsid mu üksi vivaariumisse üsna varajases loomkatsetega kohanemise faasis, mistõttu sain üpris kiiresti juba ise enda hiired süstitud. Tänan, et teostasid minu palvel kõik vajalikud kirurgilised operatsioonid hiirtel ning olen tänu võlgu ka sinu kindlatele kätele, mis kunagi maksaperfusioonil alt ei vedanud. Nii osavõtlik ning abivalmis juhendaja on suureks õnnistuseks igale tudengile.

Lisaks soovin tänada ka enda väikse laborikollektiivi ülejäänud liikmeid, kes tegid laboriskäimise väga meeldejäävaks ja toredaks. Tänan Kristina Mäemets-Allast, kes jagas efektiivseid RNA eraldamise ja qPCR-i ettevalmistamise nippe. Tänan Mariliis Klaasi, kes näitas suunda makrofaagide tuvastamise suunas ning Annika Treid, kelle efektiivse tellimustöö tulemusel olid kõik antikehad õigeaegselt kohal. Tänan ka lauanaabrit, keda praktiliselt kunagi minuga üheaegselt laboris ei viibinud, mistõttu oli laboritöö tegemine küll kõike muud kui ruumipuudulik. Samuti tänan enda suurimat toetajat Jüri Juksarit, kes küll kunagi tõeliselt ei suutnud meelde jätta, mis on minu uurimustöö eesmärk, kuid kes elas sellegipoolest minu igale katsele kogu hingega kaasa.

Järgmisena tahan tänada toredaid rakubioloogia õppetooli liikmeid, kellele artikliseminarides ikka ja jälle maksaalast uurimustööd sai tutvustatud ning kelle sünnipäevi ma laboris tähistasin. Eraldi soovin tänada Dmitri Lubenetsi, kes mulle FACS-i põhitõdesid selgitas ning pead ei kaotanud, kui ütlesin, et soovin ära lugeda kõik maksarakud, mis proovis sisalduvad. FACS-i tulemuste analüüsimisel ulatas abikäe Martin Pook, keda tänan samuti kannatliku suhtumise eest.

Tänamist väärivad ka TÜMRI arengubioloogid ja vähibioloogid SIME-st, kelle krüotoome mul lahkelt alati kasutada lubati. Arengubioloogidest saab eraldiseisvalt tänatud veel Toomas Jagomäe, kes näitas, kuidas parafiiniblokkide ettevalmistamiseks neist ilusad võrdhaardsed trapetsid välja lõigata ning kelle suurepärase mikroskoobi tundmine tuli tihti kasuks, kui sel optilisel süsteemil jälle seaded paigast ära olid keeratud.

Täna ka vivaariumi juhatajat Sulev Kuuset, kes varustas mu katseid anesteetikumidega ning toredaid vivaariumi hooldajaid, Sirjet ja Mari, kes mu hiirte eest katsetevahelistel aegadel hästi hoolt kandsid. Olen tänulik ka Biomeditsiini ja biotehnoloogia doktorikooli poolt korraldatud „Katseloomateaduse“ kursusele, mis andis juurde teadmisi, oskusi ja kogemusi loomkatsete korrektseks teostamiseks.

Suurt tänulikkust tunnen ka enda perekonna vastu, kes on olnud minu õpinguid igati toetavad. Lisaks perekonnale oli materiaalselt poolelt toeks ka *Rotalia Foundation*'i poolt määratud stipendium, mis oli motiveeriv ja toimetulekut abistav lisafaktor õpingute ja uurimustöö teostamise perioodil, mille pälvimise eest tänan Rotalia fondi.

Viimaks, kuid mitte vähemtähtsana, soovin tänada enda toredaid kursakaaslaseid, eriti Carolin Faltenit ja Karolina Noort, kes oskasid sobival hetkel ideaalselt mõtted laborist või õppetöölt eemale juhtida.

Suured tänud veelkord kõigile!

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alpini, G., Glaser, S., Robertson, W., Rodgers, R.E., Phinzy, J.L., Lasater, J. ja LeSage, G.D. (1997). Large but not small intrahepatic bile ducts are involved in secretin-regulated ductal bile secretion. *Am J Physiol.* **272**: G1064-74.
- Alpini, G., Roberts, S., Kuntz, S.M., Ueno, Y., Gubba, S., Podila, P.V., LeSage, G. ja LaRusso, N.F. (1996). Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology.* **110**: 1636-43.
- Barej, W., Ostaszewski, P. ja Pierzynowski, G. (1987). Urea and glucose formation in ovine liver after ammonia and lactate loading in vivo. *Annales de recherches veterinaires. Annals of veterinary research.* **18**: 29-34.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J. ja Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature.* **449**: 1003-7.
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., van den Brink, S., Korving, J., Abo, A., Peters, P.J., Wright, N., Poulsom, R. ja Clevers, H. (2010). Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell.* **6**: 25-36.
- Benyon, R.C. ja Arthur, M.J. (2001). Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* **21**: 373-84.
- Bilzer, M., Roggel, F. ja Gerbes, A.L. (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* **26**: 1175-86.
- Bloch, E.H. (1970). The termination of hepatic arterioles and the functional unit of liver as determined by microscopy of the living organ. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **170**: 78-87.
- Blouin, A., Bolender, R.P. ja Weibel, E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol.* **72**: 441-55.
- Borghese, E. (1959). The present state of research on WW mice. *Acta Anat (Basel).* **36**: 185-220.
- Bossard, P. ja Zaret, K.S. (1998). GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development.* **125**: 4909-17.
- Bossard, P. ja Zaret, K.S. (2000). Repressive and restrictive mesodermal interactions with gut endoderm: possible relation to Meckel's Diverticulum. *Development.* **127**: 4915-23.
- Boulter, L., Govaere, O., Bird, T.G., Radulescu, S., Ramachandran, P., Pellicoro, A., Ridgway, R.A., Seo, S.S., Spee, B., Van Rooijen, N., Sansom, O.J., Iredale, J.P., Lowell, S., Roskams, T. ja Forbes, S.J. (2012). Macrophage-derived Wnt opposes

- Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nature medicine*. **18**: 572-9.
- Bouwens, L., Baekeland, M., De Zanger, R. ja Wisse, E. (1986). Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology*. **6**: 718-22.
- Bouwens, L., Remels, L., Baekeland, M., Van Bossuyt, H. ja Wisse, E. (1987). Large granular lymphocytes or "pit cells" from rat liver: isolation, ultrastructural characterization and natural killer activity. *Eur J Immunol*. **17**: 37-42.
- Bucher, N.L. ja Swaffield, M.N. (1964). The Rate Of Incorporation Of Labeled Thymidine Into The Deoxyribonucleic Acid Of Regenerating Rat Liver In Relation To The Amount Of Liver Excised. *Cancer Res*. **24**: 1611-25.
- Calmont, A., Wandzioch, E., Tremblay, K.D., Minowada, G., Kaestner, K.H., Martin, G.R. ja Zaret, K.S. (2006). An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Dev Cell*. **11**: 339-48.
- Cameron, G.R. ja Karunaratne, W.A.E. (1936). Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J. Pathol. Bacteriol*. **42**: 1-21.
- Cantz, T., Sharma, A.D., Jochheim-Richter, A., Arseniev, L., Klein, C., Manns, M.P. ja Ott, M. (2004). Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant*. **13**: 659-66.
- Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A. ja Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**: 11452-7.
- Carpentier, R., Suner, R.E., van Hul, N., Kopp, J.L., Beaudry, J.B., Cordi, S., Antoniou, A., Raynaud, P., Lepreux, S., Jacquemin, P., Leclercq, I.A., Sander, M. ja Lemaigre, F.P. (2011). Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology*. **141**: 1432-8, 1438 e1-4.
- Chen, M., Tian, S., Yang, X., Lane, A.P., Reed, R.R. ja Liu, H. (2014). Wnt-responsive Lgr5(+) globose basal cells function as multipotent olfactory epithelium progenitor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. **34**: 8268-76.
- Cirillo, L.A., Lin, F.R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M. ja Zaret, K.S. (2002). Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell*. **9**: 279-89.
- Cirillo, L.A., McPherson, C.E., Bossard, P., Stevens, K., Cherian, S., Shim, E.Y., Clark, K.L., Burley, S.K. ja Zaret, K.S. (1998). Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J*. **17**: 244-54.

- Clark, S.A., Angus, H.B., Cook, H.B., George, P.M., Oxner, R.B. ja Fraser, R. (1988). Defenestration of hepatic sinusoids as a cause of hyperlipoproteinaemia in alcoholics. *Lancet*. **2**: 1225-7.
- Cogger, V.C., McNerney, G.P., Nyunt, T., DeLeve, L.D., McCourt, P., Smedsrod, B., Le Couteur, D.G. ja Huser, T.R. (2010). Three-dimensional structured illumination microscopy of liver sinusoidal endothelial cell fenestrations. *J Struct Biol*. **171**: 382-8.
- Costa, R.H., Kalinichenko, V.V., Holterman, A.X. ja Wang, X. (2003). Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology*. **38**: 1331-47.
- Crosby, H.A., Nijjar, S.S., de Goyet Jde, V., Kelly, D.A. ja Strain, A.J. (2002). Progenitor cells of the biliary epithelial cell lineage. *Seminars in cell & developmental biology*. **13**: 397-403.
- Daoust, R. ja Cantero, A. (1959). The numerical proportions of cell types in rat liver during carcinogenesis by 4-dimethylaminoazobenzene (DAB). *Cancer Res*. **19**: 757-62.
- Dashti, H.M., al-Sayer, H., Behbehani, A., Madda, J. ja Christenson, J.T. (1992). Liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride and the effect of superoxide dismutase and xanthine oxidase inhibitor treatment. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*. **37**: 23-8.
- de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.K., Li, V.S., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., Stange, D.E., van Es, J.E., Guardavaccaro, D., Schasfoort, R.B., Mohri, Y., Nishimori, K., Mohammed, S., Heck, A.J. ja Clevers, H. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*. **476**: 293-7.
- Delassus, S. ja Cumano, A. (1996). Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity*. **4**: 97-106.
- Denk, H., Stumptner, C. ja Zatloukal, K. (2000). Mallory bodies revisited. *Journal of hepatology*. **32**: 689-702.
- Ding, B.S., Nolan, D.J., Butler, J.M., James, D., Babazadeh, A.O., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Kobayashi, H., Shido, K., Lyden, D., Sato, T.N., Rabbany, S.Y. ja Rafii, S. (2010). Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*. **468**: 310-5.
- Doherty, J.J., 2nd, Kay, D.G., Lai, W.H., Posner, B.I. ja Bergeron, J.J. (1990). Selective degradation of insulin within rat liver endosomes. *The Journal of cell biology*. **110**: 35-42.
- Dory, D., Echchannaoui, H., Letiembre, M., Ferracin, F., Pieters, J., Adachi, Y., Akashi, S., Zimmerli, W. ja Landmann, R. (2003). Generation and functional characterization of a clonal murine periportal Kupffer cell line from H-2Kb -tsA58 mice. *J Leukoc Biol*. **74**: 49-59.
- Eckardt, K.U. (1996). Erythropoietin production in liver and kidneys. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **5**: 28-34.

- Farber, E. (1956). Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer research*. **16**: 142-8.
- Fellous, T.G., Islam, S., Tadrous, P.J., Elia, G., Kocher, H.M., Bhattacharya, S., Mears, L., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., Greaves, L.C., Chinnery, P.F., Taylor, G., McDonald, S.A., Wright, N.A. ja Alison, M.R. (2009). Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology*. **49**: 1655-63.
- Fickert, P., Trauner, M., Fuchsbichler, A., Stumtner, C., Zatloukal, K. ja Denk, H. (2002). Bile acid-induced Mallory body formation in drug-primed mouse liver. *The American journal of pathology*. **161**: 2019-26.
- Fickert, P., Trauner, M., Fuchsbichler, A., Stumtner, C., Zatloukal, K. ja Denk, H. (2003). Mallory body formation in primary biliary cirrhosis is associated with increased amounts and abnormal phosphorylation and ubiquitination of cytokeratins. *Journal of hepatology*. **38**: 387-94.
- Fickert, P., Stoger, U., Fuchsbichler, A., Moustafa, T., Marschall, H.U., Weiglein, A.H., Tsybrovskyy, O., Jaeschke, H., Zatloukal, K., Denk, H. ja Trauner, M. (2007). A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *The American journal of pathology*. **171**: 525-36.
- Freudenberg, N., Schalk, J., Galanos, C., Katschinski, T., Datz, O., Pein, U. ja Freudenberg, M.A. (1989). Identification and percentage frequency of isolated non-parenchymal liver cells (NPLC) in the mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. **57**: 109-15.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J.M., Behringer, R.R., Nakamura, T. ja Uemoto, S. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature genetics*. **43**: 34-41.
- Gardner, R.L. ja Rossant, J. (1979). Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *J Embryol Exp Morphol*. **52**: 141-52.
- Germain, L., Blouin, M.J. ja Marceau, N. (1988). Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res*. **48**: 4909-18.
- Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C.M. ja Niehrs, C. (2011). LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO reports*. **12**: 1055-61.
- Goldfischer, S., Grotsky, H.W., Chang, C.H., Berman, E.L., Richert, R.R., Karmarkar, S.D., Roskamp, J.O. ja Morecki, R. (1981). Idiopathic neonatal iron storage involving the liver, pancreas, heart, and endocrine and exocrine glands. *Hepatology*. **1**: 58-64.
- Green, E.L. (1966) Biology of the laboratory mouse. 2nd ed. Blakiston Division, New York,.

- Greenbaum, L.E., Cressman, D.E., Haber, B.A. ja Taub, R. (1995). Coexistence of C/EBP alpha, beta, growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration. Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth. *J Clin Invest.* **96**: 1351-65.
- Greene, A.K., Wiener, S., Puder, M., Yoshida, A., Shi, B., Perez-Atayde, A.R., Efsthathiou, J.A., Holmgren, L., Adamis, A.P., Rupnick, M., Folkman, J. ja O'Reilly, M.S. (2003). Endothelial-directed hepatic regeneration after partial hepatectomy. *Annals of surgery.* **237**: 530-5.
- Grisham, J.W. ja Porta, E.A. (1964). Origin and Fate of Proliferated Hepatic Ductal Cells in the Rat: Electron Microscopic and Autoradiographic Studies. *Experimental and molecular pathology.* **86**: 242-61.
- Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J.R. ja Zaret, K.S. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev.* **10**: 1670-82.
- Guo, Y., Zhang, X., Huang, J., Zeng, Y., Liu, W., Geng, C., Li, K.W., Yang, D., Wu, S., Wei, H., Han, Z., Qian, X., Jiang, Y. ja He, F. (2009). Relationships between hematopoiesis and hepatogenesis in the midtrimester fetal liver characterized by dynamic transcriptomic and proteomic profiles. *PLoS One.* **4**: e7641.
- Heymann, F., Trautwein, C. ja Tacke, F. (2009). Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflammation & allergy drug targets.* **8**: 307-18.
- Higashi, N. ja Senoo, H. (2003). Distribution of vitamin A-storing lipid droplets in hepatic stellate cells in liver lobules--a comparative study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* **271**: 240-8.
- Hsu, S.Y., Liang, S.G. ja Hsueh, A.J. (1998). Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region. *Molecular endocrinology.* **12**: 1830-45.
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., Haft, A., Vries, R.G., Grompe, M. ja Clevers, H. (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature.* **494**: 247-50.
- Hussain, S.Z., Sneddon, T., Tan, X., Micsenyi, A., Michalopoulos, G.K. ja Monga, S.P. (2004). Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. *Exp Cell Res.* **292**: 157-69.
- Ikarashi, M., Nakashima, H., Kinoshita, M., Sato, A., Nakashima, M., Miyazaki, H., Nishiyama, K., Yamamoto, J. ja Seki, S. (2013). Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. *Journal of leukocyte biology.* **94**: 1325-36.
- Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J.H., Snippert, H.J., Clevers, H. ja Toftgard, R. (2008). Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet.* **40**: 1291-9.

- Jenne, C.N. ja Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol.* **14**: 996-1006.
- Kanazawa, Y. ja Verma, I.M. (2003). Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100 Suppl 1**: 11850-3.
- Kaneda, K., Dan, C. ja Wake, K. (1983). Pit cells as natural killer cells. *Biomed Res.* **4**: 567-576.
- Karlmark, K.R., Wasmuth, H.E., Trautwein, C. ja Tacke, F. (2008). Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology.* **2**: 233-42.
- Keng, V.W., Yagi, H., Ikawa, M., Nagano, T., Myint, Z., Yamada, K., Tanaka, T., Sato, A., Muramatsu, I., Okabe, M., Sato, M. ja Noguchi, T. (2000). Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* **276**: 1155-61.
- Kimura, H., Tsudzuki, T. ja Murachi, T. (1975). Proteolytic degradation of hemoglobin-haptoglobin complex by lysosomal enzymes from rat liver. *Journal of biochemistry.* **77**: 909-12.
- Kordes, C. ja Haussinger, D. (2013). Hepatic stem cell niches. *The Journal of clinical investigation.* **123**: 1874-80.
- Kuwahara, R., Kofman, A.V., Landis, C.S., Swenson, E.S., Barendswaard, E. ja Theise, N.D. (2008). The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology.* **47**: 1994-2002.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L. ja Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* **6**: 1229-34.
- Li, J., Xin, J., Zhang, L., Wu, J., Jiang, L., Zhou, Q., Guo, J., Cao, H. ja Li, L. (2014). Human hepatic progenitor cells express hematopoietic cell markers CD45 and CD109. *International journal of medical sciences.* **11**: 65-79.
- Limaye, P.B., Bowen, W.C., Orr, A., Apte, U.M. ja Michalopoulos, G.K. (2010). Expression of hepatocytic- and biliary-specific transcription factors in regenerating bile ducts during hepatocyte-to-biliary epithelial cell transdifferentiation. *Comparative hepatology.* **9**: 9.
- Lindroos, P.M., Zarnegar, R. ja Michalopoulos, G.K. (1991). Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology.* **13**: 743-50.
- Macdonald, R.A. (1961). "Lifespan" of liver cells. Autoradio-graphic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats. *Arch Intern Med.* **107**: 335-43.

- Magami, Y., Azuma, T., Inokuchi, H., Kokuno, S., Moriyasu, F., Kawai, K. ja Hattori, T. (2002). Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver. *Liver*. **22**: 419-25.
- Malato, Y., Naqvi, S., Schurmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M.A., Grimm, D. ja Willenbring, H. (2011). Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *The Journal of clinical investigation*. **121**: 4850-60.
- McDonald, B., McAvoy, E.F., Lam, F., Gill, V., de la Motte, C., Savani, R.C. ja Kubes, P. (2008). Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *The Journal of experimental medicine*. **205**: 915-27.
- McIntyre, N., Benhamou, J.-P., Bircher, J., Rizzetto, M., Rodes, J. (1992) Oxford Textbook of Clinical Hepatology. 2nd ed. Oxford University Press, New York, United States.
- Mescher, A.L. (2009) Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 12th ed. New York: McGraw Hill Medical, United States.
- Michalopoulos, G.K. (2010). Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *The American journal of pathology*. **176**: 2-13.
- Michalopoulos, G.K., Barua, L. ja Bowen, W.C. (2005). Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology*. **41**: 535-44.
- Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L. ja Bale, W.F. (1951). The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14. *The Journal of experimental medicine*. **94**: 431-53.
- Moore, M.C., Coate, K.C., Winnick, J.J., An, Z. ja Cherrington, A.D. (2012). Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. *Advances in nutrition*. **3**: 286-94.
- Nonaka, H., Tanaka, M., Suzuki, K. ja Miyajima, A. (2007). Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev Dyn*. **236**: 2258-67.
- Ober, E.A., Verkade, H., Field, H.A. ja Stainier, D.Y. (2006). Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. *Nature*. **442**: 688-91.
- Olson, J.A. ja Gunning, D. (1983). The storage form of vitamin A in rat liver cells. *The Journal of nutrition*. **113**: 2184-91.
- Omori, N., Omori, M., Evarts, R.P., Teramoto, T., Miller, M.J., Hoang, T.N. ja Thorgeirsson, S.S. (1997). Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem cell-dependent liver regeneration in the adult rat. *Hepatology*. **26**: 720-7.
- Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M. ja Grompe, M. (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol*. **151**: 1273-80.

- Petersen, B.E., Zajac, V.F. ja Michalopoulos, G.K. (1998). Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology*. **27**: 1030-8.
- Petersen, B.E., Goff, J.P., Greenberger, J.S. ja Michalopoulos, G.K. (1998). Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology*. **27**: 433-45.
- Petersen, B.E., Grossbard, B., Hatch, H., Pi, L., Deng, J. ja Scott, E.W. (2003). Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology*. **37**: 632-40.
- Plum, W., Tschaharganeh, D.F., Kroy, D.C., Corsten, E., Erschfeld, S., Dierssen, U., Wasmuth, H., Trautwein, C. ja Streetz, K.L. (2010). Lack of glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3-mediated signaling in hepatocytes enhances chronic liver injury and fibrosis progression in a model of sclerosing cholangitis. *The American journal of pathology*. **176**: 2236-46.
- Potter, J.J., Rennie-Tankersley, L., Anania, F.A. ja Mezey, E. (1999). A transient increase in c-myc precedes the transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblast-like cells. *Liver*. **19**: 135-44.
- Preisegger, K.H., Factor, V.M., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Denk, H. ja Thorgeirsson, S.S. (1999). Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **79**: 103-9.
- Recknagel, R.O., Glende, E.A., Jr., Dolak, J.A. ja Waller, R.L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & therapeutics*. **43**: 139-54.
- Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D. ja Brinster, R.L. (1994). Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science*. **263**: 1149-52.
- Rockey, D.C. ja Weisiger, R.A. (1996). Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology*. **24**: 233-40.
- Rogler, L.E. (1997). Selective bipotential differentiation of mouse embryonic hepatoblasts in vitro. *Am J Pathol*. **150**: 591-602.
- Rugh, R. (1968) The mouse; its reproduction and development Burgess Pub. Co., Minneapolis,.
- Sasaki, K. ja Sonoda, Y. (2000). Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo. *Archives of histology and cytology*. **63**: 137-46.
- Sato, T., Laver, J.H. ja Ogawa, M. (1999). Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood*. **94**: 2548-54.
- Schirmacher, P., Geerts, A., Jung, W., Pietrangelo, A., Rogler, C.E. ja Dienes, H.P. (1993). The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *EXS*. **65**: 285-99.

- Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in cell biology*. **13**: 29-83.
- Seki, E., Tsutsui, H., Nakano, H., Tsuji, N., Hoshino, K., Adachi, O., Adachi, K., Futatsugi, S., Kuida, K., Takeuchi, O., Okamura, H., Fujimoto, J., Akira, S. ja Nakanishi, K. (2001). Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1 β . *Journal of immunology*. **166**: 2651-7.
- Shi, J., Aisaki, K., Ikawa, Y. ja Wake, K. (1998). Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol*. **153**: 515-25.
- Shiojiri, N. (1984). The origin of intrahepatic bile duct cells in the mouse. *J Embryol Exp Morphol*. **79**: 25-39.
- Sirica, A.E. (1995). Ductular hepatocytes. *Histology and histopathology*. **10**: 433-56.
- Sirica, A.E., Mathis, G.A., Sano, N. ja Elmore, L.W. (1990). Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. **58**: 44-64.
- Slater, T.F. (1987). Free radicals and tissue injury: fact and fiction. *The British journal of cancer. Supplement*. **8**: 5-10.
- Sleyster, E.C. ja Knook, D.L. (1982). Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab Invest*. **47**: 484-90.
- Staubli, W., Hess, R. ja Weibel, E.R. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes. *J Cell Biol*. **42**: 92-112.
- Strasberg, S.M. (1997). Terminology of liver anatomy and liver resections: coming to grips with hepatic Babel. *J Am Coll Surg*. **184**: 413-34.
- Sugiyama, D., Kulkeaw, K., Mizuochi, C., Horio, Y. ja Okayama, S. (2011). Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production. *Biochem Biophys Res Commun*. **410**: 301-6.
- Sydor, S., Gu, Y., Schlattjan, M., Bechmann, L.P., Rauen, U., Best, J., Paul, A., Baba, H.A., Sowa, J.P., Gerken, G. ja Canbay, A. (2013). Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **93**: 20-30.
- Zaret, K.S. (2000). Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev*. **92**: 83-8.
- Zaret, K.S. ja Grompe, M. (2008). Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science*. **322**: 1490-4.
- Zorn, A.M. (2008) Liver development, StemBook, Cambridge (MA).
- Tam, P.P., Williams, E.A. ja Chan, W.Y. (1993). Gastrulation in the mouse embryo: ultrastructural and molecular aspects of germ layer morphogenesis. *Microsc Res Tech*. **26**: 301-28.

- Tanaka, M. ja Herr, W. (1990). Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell*. **60**: 375-86.
- Tarlow, B.D., Finegold, M.J. ja Grompe, M. (2014). Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury. *Hepatology*. **60**: 278-89.
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A. ja Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*. **30**: 1425-33.
- Tremblay, K.D. ja Zaret, K.S. (2005). Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol*. **280**: 87-99.
- Tsunematsu, S., Saito, H., Kagawa, T., Morizane, T., Hata, J., Nakamura, T., Ishii, H., Tsuchiya, M., Nomura, T. ja Katsuki, M. (1994). Hepatic tumors induced by carbon tetrachloride in transgenic mice carrying a human c-H-ras proto-oncogene without mutations. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. **59**: 554-9.
- Twisk, J., Hoekman, M.F., Mager, W.H., Moorman, A.F., de Boer, P.A., Scheja, L., Princen, H.M. ja Gebhardt, R. (1995). Heterogeneous expression of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase genes in the rat liver lobulus. *The Journal of clinical investigation*. **95**: 1235-43.
- Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L. ja Weissman, I.L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. **297**: 2256-9.
- Wagner, M., Halilbasic, E., Marschall, H.U., Zollner, G., Fickert, P., Langner, C., Zatloukal, K., Denk, H. ja Trauner, M. (2005). CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology*. **42**: 420-30.
- Wake, K. (1980). Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *International review of cytology*. **66**: 303-53.
- Van der Flier, L.G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegebarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M.E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G. ja Clevers, H. (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*. **132**: 628-32.
- Vanderkerken, K., Bouwens, L. ja Wisse, E. (1990). Characterization of a phenotypically and functionally distinct subset of large granular lymphocytes (pit cells) in rat liver sinusoids. *Hepatology*. **12**: 70-5.
- Wang, L. ja Boyer, J.L. (2004). The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology*. **39**: 892-9.
- Watanabe, H., Hata, M., Terada, N., Ueda, H., Yamada, N., Yamanegi, K., Ohyama, H., Kakihana, M., Okamura, H. ja Nakasho, K. (2008). Transdifferentiation into biliary ductular cells of hepatocytes transplanted into the spleen. *Pathology*. **40**: 272-6.

- Weber, L.W., Boll, M. ja Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* **33**: 105-36.
- Vermijlen, D., Luo, D., Robaye, B., Seynaeve, C., Baekeland, M. ja Wisse, E. (1999). Pit cells (Hepatic natural killer cells) of the rat induce apoptosis in colon carcinoma cells by the perforin/granzyme pathway. *Hepatology.* **29**: 51-6.
- Wexler, E.M., Paucer, A., Kornblum, H.I., Palmer, T.D. ja Geschwind, D.H. (2009). Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. *Stem cells.* **27**: 1130-41.
- Whitmore, I. (1999). Terminologia anatomica: new terminology for the new anatomist. *The Anatomical record.* **257**: 50-3.
- Whitney, G.C. (1937). A note on the definition of Glisson's capsule. *The Anatomical Record.* **68**: 383-387.
- Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res.* **31**: 125-50.
- Wisse, E., van't Noordende, J.M., van der Meulen, J. ja Daems, W.T. (1976). The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell and tissue research.* **173**: 423-35.
- Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P. ja McCuskey, R.S. (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology.* **5**: 683-92.
- Wu, J.C., Merlino, G. ja Fausto, N. (1994). Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 674-8.
- Wu, Y., Zhang, X., Bardag-Gorce, F., Robel, R.C., Aguilo, J., Chen, L., Zeng, Y., Hwang, K., French, S.W., Lu, S.C. ja Wan, Y.J. (2004). Retinoid X receptor alpha regulates glutathione homeostasis and xenobiotic detoxification processes in mouse liver. *Molecular pharmacology.* **65**: 550-7.
- Xu, H.S., Rosenlof, L.K. ja Jones, R.S. (1993). Bile secretion and liver regeneration in partially hepatectomized rats. *Annals of surgery.* **218**: 176-82.
- Yovchev, M.I., Grozdanov, P.N., Joseph, B., Gupta, S. ja Dabeva, M.D. (2007). Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology.* **45**: 139-49.
- Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., Ichinose, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Clevers, H. ja Watanabe, M. (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell. *Nature medicine.* **18**: 618-23.

LISAD

LISA 1. Loomkatsete luba.

ASUTUSESISESEKS KASUTAMISEKS
PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM
Märge tehtud "17." veebruar 2014 . a .
Juurdepääsupiirang kehtib kuni „17.02.2019“
või
Alus: Avaliku teabe seadus § 35 lg 1 p17,



PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM LOOMKATSEPROJEKTI LOAKOMISJON

OTSUS
Tallinnas

17. veebruar 2014 nr 25

Loomkatseprojekti luba

Loomakaitseaduse § 45 lõike 2 alusel ning loomkatseprojekti loakomisjoni 17. veebruari 2014. a istungi protokoll nr 10 kohaselt otsustati järgmist:

1. Anda luba **Viljar Jaks**’ile (sünd. 05.12.1967, aadress: Riia 23, Tartu, 51010) loomkatseprojekti: „**Maksa tüvirakkude roll ja regulatsioon maksa regeneratsioonis ning maksakasvajate tekkel**“ läbiviimiseks järgmistel tingimustel:

1.1. loomkatseprojekti kavandaja ja loomkatseprojekti eest vastutav isik Viljar Jaks (sünd. 05.12.1967, aadress: Riia 23, Tartu, 51010);

1.2. loomkatseprojekti läbiviimise aeg ja koht: 01.03.2014 - 28.02.2017, Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi vivaarium, KL1202, aadress: Riia 23, Tartu, 51010;

1.3. loomkatseprojekti kaasatud isikud: Kristiina Mäemets-Allas (sünd. 31.01.1977);

1.4. katseloomade liik ja arv: 204 hiirt

1. Aasta

Kokku 1. aastal 78 Rosa26-rtTA/TRE-hiirt ning 18 Nu/Nu BalbC hiirt.

2. Aasta

Erinevate maksa rakuliste komponentide osa selgitamine regeneratsioonis vajaks 3 CreERT liini puhul 3 katsepunkti iga kahjustuse meetodi kohta. Kontrollina kasutatakse kahjustamata hiiri. Seega kasutatavate hiirte arv selles katses on 54. (3 Cre liini x 3 katsepunkti x (3 maksakahjustusega hiirt + 3 kontrollhiirt))

3. Aasta

Lgr5-ekspressioneerivate rakkude päritolu kindlakstegemine nõuab 2 CreERT liini kasutamist 3 maksakahjustuse meetodi puhul. Kuna ka siin on oluline kontrollide

lisamine siis vajatakse samuti 54 hiirt (2 Cre liini x 3 katsepunkti x 3 maksakahjustusega hiirt x 3 kontrollhiirt))

1.5. loomkatses rakendatavad menetlused:

1. Loomkatsete käigus tekitatakse hiirte maksas maksakahjustus järgmistel viisidel:

a) CCl₄ (süsiniktetrakloriid 1,25mg/kg) intraperitoneaalne (i.p.) injektsioon lahustatuna taimeõlis tekitab keskmise astmega maksakahjustus, mis paraneb ca 7 päeva jooksul. Tegemist on 24h jooksul mööduva keskmise astme valu/kannatusega. Valu vähendamiseks süstitakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas. Juhul kui hiirel tekivad tugeva kannatuse sümptomid või peritoneaalärritusnähud hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

b) DDC (3,5-diethoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiin) dieet (100mg/ toidu kg kohta) 7 päeva põhjustab keskmise kahjustuse, mis paraneb 1 nädalaga. Kuna valu põhjus on maksa pais/turse siis valuvaigistite manustamine ei anna soovitud efekti. Juhul kui hiirel tekivad tugeva kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

c) osaline maksaresektsoon üldanesteesias (hypnorm/dormicumi vesilahuse - fentanüültsitraat 0,079 mg/ml; fluanision 2,5 mg/ml ja midasolaam 1,25 mg/ml intraperitoneaalne süst, 0,05 - 0,1 ml/10g, anesteesia kestus ca 60 min). Kõhuõõs avatakse ning vasak sagar eemaldatakse (30% maksast) ja kõhuõõs suletakse. Kuna tegemist on tugeva valuga manustatakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas 4 postoperatiivse päeva jooksul. Juhul kui valu sümptomid püsivad jätkatakse valuvaigisti manustamist. Maks regenereerub 2 nädalaga. Hiired hukatakse 2 nädala möödumisel peale protseduuri. Kui hiir ei taastu 24h jooksul või tekivad kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

2. CreERT rekombinaasi aktiveerimiseks süstitakse hiiri tamoksifeeni lahusega taimeõlis 1-10mg/hiire kohta 1-2 korda i.p. Tegemist on väga lühiajalist ebamugavustunnet, kerget valu ja stressi põhjustava protseduuriga. Sel juhul hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 135 hiirel.

3. Spontaansete maksakasvajate tekitamine ühekordse dietüülnitroosamiini (DEN) õlilahuse süstiga (i.p. 25mg/kg kuni 4x üle päeva, 21 päeva vanustele hiirtele) ning pideva fenobarbitaali manustamisega joogivees (0,05%). Kasvajate arengut jälgitakse 40 nädala jooksul. DEN süstid põhjustavad lühiajalist ebamugavust (vt punkt 2). Fenobarbitaali manustamine ei tekita mingeid vaevusi. Maksakasvajate teke on üldiselt valutut, kuid võivad esineda tõsised tüsistused (pais ja sellest astsiit, valusündroom), mis väljenduvad hiirte apaatsuses, sundasendis, kaalulanguses üle 20%). Nende sümptomite ilmnemisel hiired hukatakse kohe. Kergema valu sümptomite ilmnemisel manustatakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas. Protseduur viiakse läbi 39 hiirel.

5. Tetratsükliinsõltuva transkriptsiooni aktiveerimiseks manustatakse hiirtele doksütsükliini (2 g/l) joogivees, millele on lisatud 5% sahharoosi. Ka pikaajaline doksütsükliini manustamine ei oma mingeid negatiivseid mõjusid ei hiirte arengule, elukvaliteedile ega viljakusele. Protseduur viiakse läbi 78 hiirel.

6. Maksarakkude transplantatsiooniks, kõhuõõs avatakse üldanesteesias ja sorditud rakud süstitakse maksa vasakusse sagarasse kasutades insuliinisüstalt (G30). Kõhuõõs suletakse, haav katakse ning hiirele manustatakse valuvaigistit subkutaanselt. Hiirt jälgitakse 2x päevas 3 postoperatiivse päeva jooksul. Valuvaigistit manustatakse nagu

punkti 1a 3 postop päeva jooksul 1x päevas. Kui hiir ei taastu 24h jooksul või tekivad kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 18 hiirel.

Humaansete lõpp-punktide üldised kriteeriumid: Katsed lõpetatakse enne planeeritud katse lõppu hiirte üldseisundi halvenemisel (esinevad kannatussümptomid: spetsiifiline sundasend, loidus, toidust keeldumine); kaalulangusel üle 20%, kui tekib astsiit või kui operatsioonide korral loom ei ole 2. postoperatiivse päeva lõpuks taastunud (loom on loid, sundasendis).

Loomade hukkamise meetodika: Loomad hukatakse tservikaalse dislokatsiooni teel katse lõppemisel või ülalpool defineeritud humaansete lõpp-punktide saabumisel. Ühtegi katselooma ei kasutata katsetes korduvalt. Loomadel läbi viidavate katsete üksikasjaline kirjeldus on toodud punktis 1.

2. Otsust on õigus vaidlustada haldusmenetluse seaduses või halduskohtumenetluse seadustikus ettenähtud korras ja tähtaja jooksul.

Mario Plaas
/allkirjastatud digitaalselt/

Komisjoni esimees

	<p>TARTU ÜLIKOOL</p>  <p>ARSTITEADUSKOND</p>
	<p>TUNNISTUS</p>
	<p>nr 14</p>
	<p><i>Kadi Lõhmussaar</i></p>
	<p>on Tartu Ülikooli arstiteaduskonnas läbinud koolituse</p>
	<p><i>Katseloomateadus I</i></p>
	<p>ARBS.00.001 (5 EAP) ajavahemikul 27.01.2014 – 07.02.2014</p>
	<p>Koolituse läbiviimist on toetanud Euroopa Liit Euroopa Sotsiaalfondist</p>
	<p>Koolituse eesmärgiks oli anda väljaõpe vastalt EL direktiivi 2010/63/EL, artikkel 23, punkt 2 toodud ülesannete läbiviimiseks vastavalt a) katsete tegemine loomadega; c) loomade hooldamine; d) loomade surmamine ning põhineb Põllumajandusministri määral nr 22; RT I, 12.03.13;6.</p>
	<p> Kai Õkva vastutav õppejõud</p>
<p>Lisa: sisukirjeldus ja omandatud protseduuride loetelu loomaliigiti</p>	
<p>Tartu, 07.02.2014</p>	

**TARTU ÜLIKOO
ARSTITEADUSKOND**

Kadi Lõhmusaar

on Tartu Ülikooli arstiteaduskonnas läbinud ajavahemikul 27.01.2014 – 07.02.2014 koolituse **Katseloomateadus I** (Laboratory Animal Science I), ARBS.00.001 (koolituse maht: 130 tundi=5EAP)

KOOLITUSE SISU:

Kursusel käsitleti järgmiseid teemasid: kehtivaid riigisisesed, Euroopa Liidu ja rahvusvahelised õigusakte, mis käsitlevad katseloomade kasvatamist, katseloomadega varustamist ja katseloomade kasutamist; katseloomade hariduslikel ja teaduslikel eesmärkidel kasutamise eetilisi aspekte; loomkatse asendamise, vähendamise ja täiustamise nõudeid; hiire ja roti bioloogia, sealhulgas anatoomia, füsioloogia, paljunemine, geneetika ja geneetiline muundamine; loomade liigiomane käitumine ja nende elukeskkonna mitmekesistamine; hiire ja roti käsitlemismeetodid ja katsed; hiirte ja rottide heaolu ja nende tervise seire; loomade stressi, valu ja kannatuste tuvastamine fookusega hiirel ja rotil; anesteesia ja analgeesia; katseloomade hukkamine.

Koolitusel osalenu on teostanud järgmised praktilised protseduurid:

Hiirega teostatud protseduurid	Rotiga teostatud protseduurid
1) Hiire käsitamine:	1) Roti käsitamine:
Sabast tõstmine	Sabast tõstmine
Scruff meetod	Scruff meetod
Soo määramine	Soo määramine
2) Märkimine:	2) Märkimine:
Markeriga	Markeriga
kõrvade augustamine (anesteseeritud loomal)	kõrvade augustamine (anesteseeritud loomal)
Varbunumbrite lugemine	
3) Süstimine:	3) Süstimine:
-nahaalune s.c.	-nahaalune s.c.
-kõhuõõnde i.p. (kohustuslik)	-kõhuõõnde i.p.
4) Vere võtmine:	4) Maosisene annustamine i.g.
-vena saphena (jala veenist)	5) Vere võtmine:
-submandibulaarne verevõtmine	-vena saphena (jala veenist)
6) Looma hukkamine	-saba veen ja arter
-südame punktiskoon	6) Looma hukkamine
-õledoo	-õledoo
7) Tuvastatud looma surma	7) Tuvastatud looma surma
8) Teostatud lahangu	8) Teostatud lahangu

Läbiviidud protseduure kontrollisid: Jenni Niiranen, Arja Konttinen, Ivar Blank, Heli Säre, Sulev Kuuse

Kai Õkva

vastutav õppejõud



LISA 3. Kahjustuseta hiire maks peale X-gal'i töötlust. Tuumad on värvitud hematoksüliiniga. Mõõtlõik 50 µm.



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kadi Lõhmussaar

(sünnikuupäev: 30.06.1991)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “LGR5-positiivsete rakkude päritolu kirjeldamine kahjustatud maksas”, mille juhendajad on Viljar Jaks (MD, PhD) ja Janeli Viil (MSc),
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.07.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015